Aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Nachweis der interferoninduzierten 2–5 Oligoisoadenylsynthetase in menschlichen Lymphocyten und Tumorzellinien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Irene Thomä
aus Heidelberg

1984

Aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Nachweis der interferoninduzierten 2–5 Oligoisoadenylsynthetase in menschlichen Lymphocyten und Tumorzellinien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Irene Thomä
aus Heidelberg

1984

Dekan: Professor Dr. H.D. Waller

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Treuner

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Moeller

Herrn Prof.Dr.D.Niethammer danke ich für die Anregung zur Bearbeitung dieses Themas und Herrn Priv.Doz.Dr.J.Treuner und Herrn Dr.G.Dannecker für die beratenden und kritischen Hinweise, die zum Abschluß dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Die Induktion des antiviralen Zustandes	1
1.2.	Die Synthese von antiviralen Proteinen nach IFN-Kontakt	4
1.2.1.	Das System der Proteinkinase	5
1.2.2.	Das System der 2-5 Oligoisoadenylsynthetase	5
1.2.2.1.	Die 2-5 Oligoisoadenylsynthetase	6
1.2.2.2.	Die Endoribonuklease	7
1.2.2.3.	Die Phosphodiesterase	8
1.3.	Weitere Wirkungen der 2-5 Synthetase	9
1.4.	Die Bedeutung des Nachweises der 2-5 Synthetase	11
2.	Materialien	12
2.1.	Materialien für die Enzymbestimmung und die Zucht der Zellinien	12
2.1.1.	Materialien für die Enzymbestimmung	12
2.1.2.	Materialien für die Zucht der Zellinien	13
2.2.	Interferone	13
2.3.	Zellinien	14
2.4.	Geräte	14
2.5.	Patienten	14
2.6.	Herstellung von Lösungen und Puffern	15
2.6.1.	Herstellung der Lösungen	15
2.6.2.	Herstellung der Puffer	16
2.6.3.	Herstellung des Kulturmediums RPMI 1640	17

Seite

3. Methoden 18

3.1. Die Herstellung von Extrakten aus menschlichen mononukleären weißen Blutzellen 18

3.2. Die Herstellung von Tumorzellextrakten nach IFN-Stimulation 18

3.2.1. Die Kultivierung der Zellen 18

3.2.2. Die Interferonstimulation 19

3.2.3. Die Lyse der Zellen 19

3.3. Die Stimulation von Lymphocyten mit Interferon 20

3.4. Der Nachweis der 2-5 Synthetaseaktivität 20

4. Ergebnisse 29

4.1. Die 2-5 Synthetase in menschlichen Lymphocyten 29

4.1.1. Die 2-5 Synthetase in Lymphocyten von Versuchspersonen ohne Infekte oder Tumorerkrankungen 29

4.1.2. Die 2-5 Synthetase während bakterieller und viraler Infektionen 32

4.1.3. Die 2-5 Synthetase bei Kindern mit malignen hämatologischen und Tumorerkrankungen 36

4.1.4. Der 2-5 Synthetaseanstieg unter IFN-Therapie 42

4.2. Der 2-5 Synthetaseanstieg nach IFN-Stimulation in vitro 45

4.2.1. Der Enzymanstieg nach IFN-Gabe in Lymphocyten 45

4.2.2. Die Stimulation von Tumorzellen mit verschiedenen IFN-Typen 46

4.2.3. Die Enzymaktivität in Tumorzellextrakten in Abhängigkeit von Interferonkonzentration und Zeit 49

4.2.3.1. Der Enzymanstieg in Abhängigkeit von der Zeit 49

4.2.3.2. Der Enzymanstieg in Abhängigkeit von der IFN-Konzentration 53

Seite

5. Diskussion 56

5.1. Die Methodik 56

5.2. Der Nachweis der 2-5 Synthetase 60

5.2.1. Der 2-5 Synthetasenachweis in verschiedenen Zellen 60

5.2.2. Enzymaktivitäten während viraler und bakterieller Erkrankungen 63

5.2.3. Enzymveränderungen während maligner Tumorerkrankungen 66

5.2.4. Der Enzymanstieg unter IFN-Therapie 67

5.3. Die Interferonstimulation von Zellen - in vitro 68

5.3.1. Übersicht über IFN-Stimulationsversuche mit verschiedenen Zellen 68

5.3.2. Die IFN-Stimulation von menschlichen Lymphocyten 72

5.3.3. Der 2-5 Synthetaseanstieg unter verschiedenen IFN-Typen bei Zellinien 72

5.3.4. Die Interferonstimulation von verschiedenen Tumorzellen 73

5.4. Der Nachweis der 2-5 Synthetase: Ein Diagnostikum für bestimmte Erkrankungen? 75

6. Zusammenfassung 82

7. Literaturverzeichnis 85

1. Einleitung

Interferone sind Glykoproteine und Proteine, die als Antwort auf Virusinfektionen und andere Stimuli von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden (34).
Aus diesen Zellen einmal freigesetzt, werden sie an andere Zellen gebunden und treten mit diesen nichtinfizierten bzw. unstimulierten Zellen in Interaktion (51).
Dadurch wird in diesen Zellen eine große Zahl von Mechanismen ausgelöst: Bildung eines antiviralen Zustandes, Wachstumshemmung von Zellen, Änderung der Phagocytentätigkeit der Makrophagen, Aktivierung der natürlichen Killerzellen, Unterdrückung der Antikörpersynthese u.v.a. (120).
Die zahlreichen Wirkungen auf zelluläre Funktionen sowohl auf biologischer als auch molekularer Ebene zu erklären, ist in den letzten Jahren zunehmend ein Anliegen der Interferonforschung geworden.

1.1. Die Induktion des antiviralen Zustandes der Zellen durch Interferon

Im Mittelpunkt des Interesses stand zunächst die sogenannte "antivirale" Wirkung: Zellen, die mit homologem Interferon (IFN)[1] behandelt werden, entwickeln eine Resistenz gegen virale Infektionen (120).
Unter der Gabe von Anti-IFN-Serum verläuft eine Virusinfektion sehr viel ernster (40).
Es scheint gesichert zu sein, daß IFN nicht eine direkte Virusinaktivierung bewirkt, sondern daß es sich an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche bindet, um dann die Mechanismen der Virusreplikation zu beeinflussen (37).

[1] Die verschiedenen IFN-Typen werden hier summarisch mit 'IFN' abgekürzt. Für Unterschiede s. unter 5.3.3.

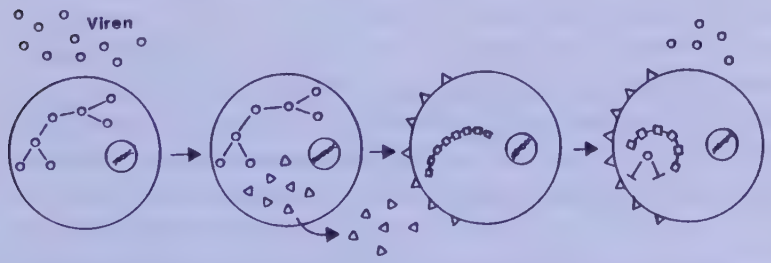
Während die ersten Schritte der Virusreplikation, nämlich die Adsorption des Virus (die erste Kontaktaufnahme mit der Zelloberfläche), und die Penetration (das Eindringen des Viruspartikels in das Zellinnere) sowie das Uncoating (die Freisetzung der Virusnukleinsäure aus dem Proteinmantel) unverändert bleiben, kann es zu Veränderungen der Biosynthese von Virusnukleinsäure und Virusproteinen kommen (37, 87).
Es kann entweder die Transcription, d.h. die Synthese viraler mRNA[1] oder die Translation, d.h. die Umsetzung des Codes der mRNA in die Produktion der Virusproteine verändert werden.
Wenn es auch möglich ist, daß IFN beide erwähnten Schritte der Virusreplikation hemmt, deuten zahlreiche Versuche darauf hin, daß die Translation der häufigste Angriffspunkt ist (12, 30, 38, 42, 53, 106) und vermindert wird.
Weiterhin ist über eine veränderte Methylierung viraler mRNA (114) und über eine Inaktivierung der tRNA[2] (113, 128) berichtet worden.
Die Ergebnisse scheinen auch vom Virustypen abzuhängen: So ergaben sich bei der Untersuchung von zwei Virustypen mit dsDNA[3] Genomen zum einen Hinweise für eine Translationshemmung (bei Vacciniavirus), zum anderen Hinweise für eine Transcriptionshemmung (bei Simianvirus SV 40), und ähnliche differente Resultate ergaben sich bei zwei Virustypen mit ssRNA[4] Genomen (nämlich Stomatitis VSV bzw. Influenzaviren) (87).
Die Tatsache, daß die Proteinsynthese von RNA- und DNA-Viren gehemmt wird, wobei die zelluläre Protein-

[1] mRNA = messenger Ribonukleinsäure
[2] tRNA = transfer RNA
[3] dsDNA = doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
[4] ssRNA = einsträngige RNA

synthese jedoch offensichtlich unbeeinflußt bleibt, läßt Fragen hinsichtlich der Regulationsmechanismen offen.

Die IFN-Synthese in einer Zelle kann nicht nur durch virale dsRNA getriggert werden. Auch synthetische Inducer, wie z.B. Poly (rI):(rC)[1], können eine IFN-Produktion bewirken. Offenbar müssen dafür gewisse strukturelle Erfordernisse erfüllt sein: z.B. eine Länge von mehr als 60 Nukleotiden mit richtiger Basenpaarung - so daß Doppelstränge vorliegen - und genügend OH-Gruppen in beiden Nukleotidsträngen (4); dreisträngige Polymere sind ebenso unwirksam wie RNA/DNA Hybride (90).

Wenn Zellen mit IFN in Kontakt gekommen sind, werden die spezifischen antiviralen Mechanismen erst dann aktiviert, wenn auch eine Virusinfektion stattgefunden hat (38).
Dadurch hat die dsRNA eine "Doppelrolle":
sie induziert die IFN-Synthese, und in ihrer Anwesenheit bildet sich die volle antivirale Potenz aus (55, 56, 76).
Es werden Hemmstoffe aktiviert, die in der Proteinsynthese agieren (107) (vgl. Abb.1).



Herstellung des antiviralen Zustandes unter Interferon Abb. 1 (mod. n. 123)

[1] Poly (rI):(rC) = Polyriboinosin-Polyribocytidyl-Säure

1.2. Die Synthese von "antiviralen" Proteinen nach IFN-Kontakt

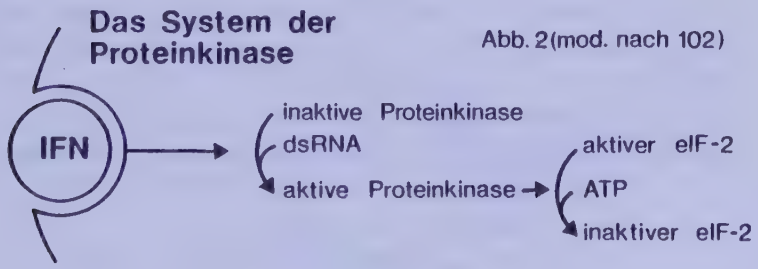
Aus den vorangehenden Überlegungen könnte man folgern, daß IFN indirekt über die Synthese spezifischer mRNA die Bildung von Hemmstoffen der Proteinsynthese, sogenannten "antiviralen" Proteinen, bewirkt.
Weder in enukleierten Zellen(97), noch unter Hemmung der RNA und/oder Proteinsynthese (37) entsteht unter IFN-Einfluß Virusresistenz.
Es kommt also nicht zur Aktivierung präformierter Enzyme, sondern zu einer de novo Synthese.
Inzwischen sind zahlreiche solcher Proteine nachgewiesen, charakterisiert und z.T. auch isoliert worden (28, 32, 41, 66, 71, 79, 80, 84, 140).
Unter diesen Proteinen sind drei Systeme von besonderer Wichtigkeit in den derzeitigen Untersuchungen:

1. ein Protein, das eine Proteinkettenverlängerung verhindern kann, indem es die tRNA verändert (102)
2. eine Proteinkinase
3. ein System, bestehend aus drei sich gegenseitig beeinflussenden Enzymen, nämlich die 2-5 Oligoisoadenylsynthetase, eine Endoribonuklease und eine Phosphodiesterase.

Auf die beiden letztgenannten Enzymsysteme soll im folgenden näher eingegangen werden.
Es ist eine bisher umstrittene Theorie, ob diese Mediatoren primär in die Proteinsynthese eingreifen.
Auch der Zusammenhang zwischen den Proteinen untereinander, ihre eventuell ineinandergreifenden und sich ergänzenden Wirkungen sind noch nicht geklärt.

1.2.1 Das System der Proteinkinase

Durch die Proteinkinase wird die Translation gestört, indem der Initiationsfaktor eIF-2 durch Phosphorylierung blockiert wird.
Dadurch wird wahrscheinlich der Beginn der Proteinsynthese verhindert, da sich die für den Kettenbeginn spezifische tRNA, die Met-tRNA (die an einem Ende ein formyliertes Methionin als Aminosäure trägt, durch die die Peptidbindung notwendige Aminogruppe blockiert wird) nicht mit einer 30 s und einer 50 s Ribosomenuntereinheit zu einer funktionstüchtigen Einheit verbinden kann (30, 31, 42, 83, 113, 128). (vgl. Abb. 2)



1.2.2. Das System der 2-5 Oligoisoadenylsynthetase

Es setzt sich zusammen aus der
2-5 Oligoisoadenylsynthetase (1.2.2.1.)
Endoribonuklease (1.2.2.2.)
Phosphodiesterase (1.2.2.3.)

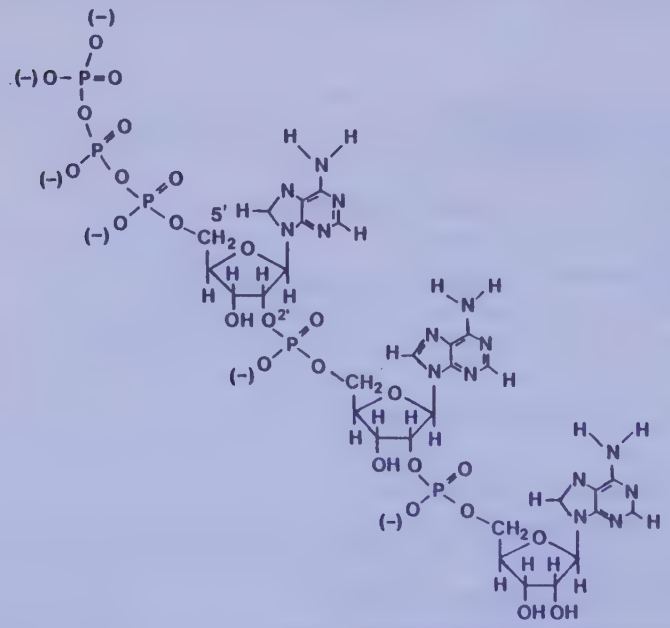
1.2.2.1. Die 2-5 Oligoisoadenylsynthetase

1976 konnte aus Extrakten von IFN behandelten L 929 Mäusezellen ein dsRNA und ATP[1] abhängiger Hemmstoff der Proteinsynthese isoliert werden, der in Kontrollzellen nicht nachgewiesen werden konnte (104).
Es handelte sich um Oligonukleotide mit der allgemeinen Formel

$$ppp(2'p5'A)_n 2'p5'A_{OH}$$

mit n= 1 - 6 (26), abgekürzt mit (2'-5')A, unter denen das Trimer vorherrschend ist (58) (vgl. Abb. 3).

Das Trimer der 2-5 Oligonukleotide Abb.3 aus(9)



Diese Nukleotide waren bereits als Inhibitoren der Proteinsynthese bekannt (44).
Daneben fanden sich biologisch inaktive Monophosphate (81) und Diphosphate, die - vielleicht durch Rephosphorylierung - in vivo aktiv sind (39).

[1]ATP = Adenosintriphosphat

Die Synthese der (2'-5')A erfolgt nach der stöchiometrischen Gleichung
(n+1) ATP $\longrightarrow$ ppp (2'-5'A)$_n$ + nPP (Pyrophosphat)
(aus (72)).
Das diese Reaktion katalysierende Enzym ist die 2-5 Oligoisoadenylsynthetase (2-5 Synthetase).
Sie steigt nach 2 Stunden (61) proportional der IFN-Konzentration bis zu einem Aktivitätsmaximum nach ca. 15-24 Stunden (118) an und fällt dann ab (101).

Für die Enzymaktivierung ist, außer der Anwesenheit von IFN auf der Zelloberfläche (101), die Anwesenheit von ATP bzw. eines ATP regenerierenden Systems (44, 88) und von dsRNA erforderlich, für die gewisse strukturelle Erfordernisse erfüllt sein müssen (4, 90). Die Enzymausbeute ist außerdem von Elektrolytkonzentrationen, pH-Wert und Temperatur, wie auch der Versuchsmethodik abhängig (105). Die 2-5 Synthetase hat nicht nur die Eigenschaften einer ATP Polymerase sondern katalysiert auch die Synthese verschiedener Heterooligonukleotide (54, 122).

1.2.2.2. Die Endoribonuklease

Die 2-5 A sind für sich alleine nicht wirksam (102), sondern erst indirekt über die Aktivierung einer Endoribonuklease (RNase) (22, 133). Dadurch wird erklärbar, daß die Hemmung der Proteinsynthese nicht sofort nach Zugabe von 2-5 A zu Zellextrakten beginnt (44, 45).
Die RNase baut endogene oder zu zellfreien Systemen hinzugefügte mRNA ab (8, 12, 17, 21, 107, 111, 131). Auch über den Abbau von rRNA[1] ist berichtet worden (50, 100, 101, 136) wie auch über (trotz RNase Einfluß) unveränderte rRNA (75).

[1] rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure

Die RNase ist nicht spezifisch für bestimmte Nukleotidsequenzen und baut - in vitro - einsträngige RNA, gleich ob viral oder wirtseigen, ab (8, 12, 29, 35, 53, 111, 117). Doch auch über verschiedene Abbaugeschwindigkeiten für verschiedene RNAs (24, 33, 98, 106) und über eine alleinige Hemmung der viralen Proteinsynthese ist berichtet worden (43, 93, 137).
Es wurde postuliert, daß es durch eine Lokalisation der 2-5 A in unmittelbarer Nähe zur v i r a l e n dsRNA zu einer Aktivierung d e r RNase kommt, die sich in den viralen Replikationseinheiten befindet (2, 8, 93). Dadurch könnte es - in vivo - zu einem bevorzugten Abbau viraler mRNA kommen, die in diesen Replikationseinheiten synthetisiert wird (74).
Die Aktivierung der RNase ist vollständig von der Anwesenheit intakter nichtdephosphorylierter 2-5 A abhängig (58). Dabei scheint die Menge an aktivierbarer RNase die Aktivität der 2-5 A in der Proteinsynthesehemmung zu beschränken (130).
Aktivierungsmechanismus und spezifische Wirkungsweise der RNase sind noch unklar.

1.2.2.3. Die Phosphodiesterase

Eine Phosphodiesterase (PD) baut 2-5 A ab (3, 88, 110, 131) nach der Gleichung

$pppA(2'p5'A)_n \xrightarrow{\text{-------}} ATP + n\ 5\text{-}AMP$ (aus 110).

Sie reguliert damit indirekt die Aktivität der RNase. Es wurde einerseits über eine Erhöhung der Enzymaktivität (61, 110), andererseits über unveränderte Enzymspiegel unter IFN-Behandlung (11, 69, 131) berichtet. Die Regulationsmechanismen für die PD sind noch ungeklärt. Unter Wachstumsstimuli (z.B. in Lymphocyten, die mit Concavalin A, einem Mitogen, behandelt worden waren) konnte eine Erhöhung der PD beobachtet werden (101). Auch scheint die PD für einen dsRNA unabhängigen und mit tRNA reversibel zu machenden Abbau des

3'CpCpA Endes der tRNA verantwortlich zu sein (110). Die Menge an vorhandenen 2-5 A in stimulierten Zellen spiegelt das Gleichgewicht zwischen Synthese (vermittelt durch die 2-5 Synthetase) und den Abbau (vermittelt durch die PD) wieder.
So wie diese Enzymaktivitäten schwanken können, schwankt die Menge an 2-5 A und damit das Ausmaß der Proteinsynthesehemmung in verschiedenen Zellen.

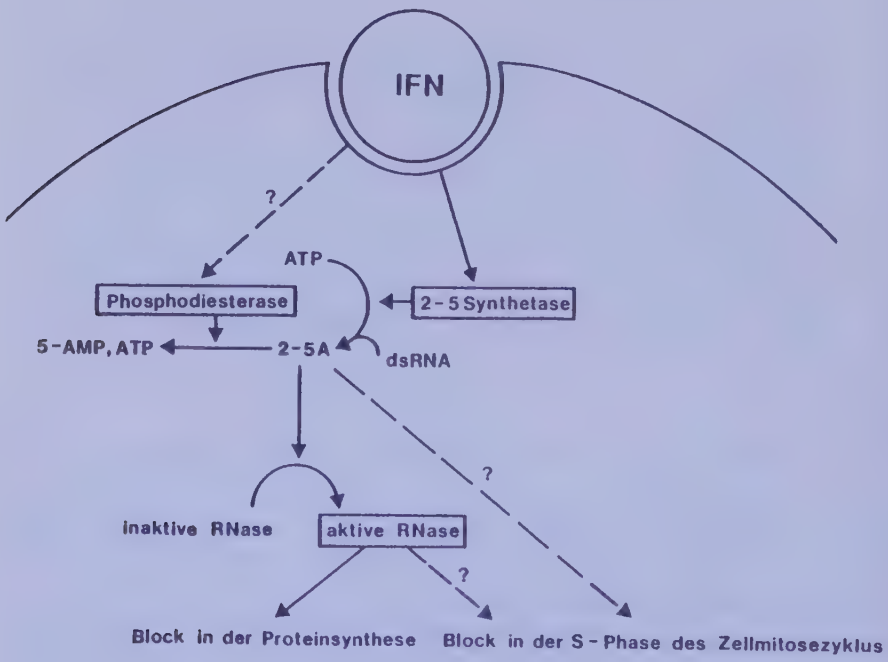
1.3 Weitere Wirkungen des 2-5 Synthetase-Systems

Während der Zusammenhang der 2-5 Synthetase mit der Induktion des antiviralen Zustandes gesichert zu sein scheint, sind weitere Aufgaben dieses Enzyms im IFN-System noch relativ unklar.
Einige antizelluläre Wirkungen sind belegt worden. Es kommt unter der Einwirkung der 2-5 A zu einer Hemmung der DNA-Synthese (49, 63, 64) und der Lymphocytenmitose (62). Andere Zellen zeigten jedoch trotz eines Anstiegs der 2-5 Synthetase keine Wachstumshemmung (126).

Abb. 4 zeigt eine Zusammenfassung der Wirkungen der 2-5 Synthetase im IFN-System.

Abb. 4

Das System der 2-5 Oligoisoadenylsynthetase



1.4 Die Bedeutung des Nachweises der 2-5 Synthetase

Die IFN-Bestimmung beruhte bisher auf biologischen Versuchen, nämlich auf der Fähigkeit von (unter IFN-Einfluß stehenden) Zellen, eine Virusvermehrung zu hemmen. Diese Bestimmungen sind relativ aufwendig, und die Untersuchung zeitlicher Abläufe der IFN-Wirkung sind bei rascher Elimination oft nicht möglich. Vor allem bei Virusinfekten verschwindet das IFN schnell im Serum.

Die hier dargestellte Nachweismethode der 2-5 Synthetase, die von SCHATTNER et al. (108) entwickelt wurde und für diese Versuchsreihen nachvollzogen wurde, wird als mögliches Testsystem für den Nachweis eines IFN-Einflusses auf Zellen zur Diskussion gestellt.

Die 2-5 Synthetasespiegel wurden sowohl in Lymphocyten gesunder und kranker Versuchspersonen wie auch in verschiedenen Geweben aus Zellkulturen nachgewiesen, um Bedingungen herauszuarbeiten, die auf unterschiedliche Aktivierungen der IFN-Mechanismen hindeuten könnten.

Es werden mögliche andere Funktionen und Einflüsse der 2-5 Synthetase im Zellmetabolismus dargestellt, z.B. eine eventuelle Wachstumshemmung von Zellen unter Vermittlung der 2-5 Synthetase.

Da IFN zunehmend in der Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfekten eingesetzt wird, könnte dieses Testverfahren vielleicht eine Alternative zu den bisherigen Versuchstechniken sein.

2. Materialien

2.1. Materialien für die Enzymbestimmung und die Haltung der Zellinien

2.1.1. Materialien für die Enzymbestimmung

Adenosin 5' - (α - ^{32}P) Triphosphat Triäthylammoniumsulfat spezifische Aktivität 10-40 Ci /mmol radioaktive Konzentration 1 mCi / ml	Amersham
Poly(rI):(rC) Agarosekügelchen	PL Biochemicals
Bakterielle Alkalische Phosphatase (Escherichia coli) spezifische Aktivität 20-30 U/mg Protein	Sigma
Creatinphosphokinase spezifische Aktivität 80 U/mg Protein	Sigma
HEPES	Sigma
$MgCl_2$	Sigma
KCl	Sigma
Dithiothreitol	Sigma
Glycerol	Sigma
Nonidet P 40	Sigma
Creatinphosphat	Sigma
Trizma	Sigma
Glycin	Sigma
Poly (rI):(rC)	Sigma
Adenosin - 5' - Triphosphat	Sigma
phosphatgepufferte Saline (PBS) ohne Ca^{2+}, ohne Mg^{2+}	Dulbecco
Ficoll-Hypaque (Lymphoprep^R) spezifische Dichte 1,077 g/ml	Nyegaard & Co, Oslo
Glaswolle	Lenze&Rilling, Reutlingen

2.1.2 Materialien für die Zucht der Zellinien

Minimal Essential Medium (MEM) mit Glutamin Phenolrot Bicarbonat 0,25 g/l HEPES Puffer 20 mM Gentamycin 50 ug/ml Fetales Kälberserum (FKS) 5 %	Rentschler
Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert	Rentschler
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) ohne Ca^{2+}, ohne Mg^{2+}	Gibco
Ampuwa (steriles pyrogenfreies Wasser)	Fresenius
Versen - Trypsin	Rentschler
RPMI 1640, ohne $NaHCO_3$, ohne L-Glutamin	Seromed
$NaHCO_3$ (7,5 %)	Seromed
L-Glutamin (200 mM)	Seromed
Kulturflaschen, Plastik, 250 ml Nuncon^R	Intermed
Sechs-Loch Platten mit Deckel, 35 mm Fläche 9,62 cm^2, Inhalt 9,6 ml	Greiner Labortechnik

2.2. Interferone

Alle aufgeführten Interferontypen wurden in gefrorenem Zustand aufbewahrt.

α-IFN aus menschlichen Leukocyten, spezifische Aktivität 1×10^6 IU/mg Protein (Dr.K. CANTELL, Helsinki (19))

α_2-IFN aus E.coli, spezifische Aktivität 1×10^6 IU/mg Protein (M. FOUNTOULAKIS, Universität Zürich (92))

β-IFN aus menschlichen Fibroblasten, spezifische Aktivität $2,3 \times 10^6$ IU/mg Protein (Fa. Rentschler, Laupheim (124))

(Die zwei verwendeten Chargen werden als β_k bzw. β_L-IFN bezeichnet.)

γ-IFN, spezifische Aktivität 2500 IU/mg Protein (H.K. NIELSEN, Interferon Research Laboratory, Hjoerring, Denmark)

Mock-IFN: bei 40°C hitzeinaktiviertes β-IFN der Fa. Rentschler, spezifische Aktivität 90 IU/mg Protein

2.3. Zellinien

Neuroblastomlinie IMR - 32 (ATCC CCL 127), etabliert von W.W.NICHOLS, J.LEE, S.DWIGHT, April 1967 (125) Sloan-Kettering Institute of Cancer Research (abgekürzt mit CCL 127)

Embryonale Rhabdomyosarkomlinie RD (ATCC CCL 136), etabliert von Mc ALLISTER Februar 1968 (78)

Osteosarkomlinie SAOS-2, zur Verfügung gestellt von Dr.J.FOGH Sloan-Kettering Institute of Cancer Research (36) (abgekürzt mit RD)

Neuroblastomlinie SK-N-FJ, zur Verfügung gestellt von Dr.J.FOGH Sloan-Kettering Institute of Cancer Research

2.4. Geräte

Coulter Counter	Coulter Electronics, Duntable, England
Brutschrank	National^{R}, Heineke Com.
Szintillationszähler	Tri Carb Liquid Szintillation Spectrometer (Model 3385), Packard

2.5. Patienten

Die Patienten waren Kinder, die stationär und/oder ambulant in der Tübinger Universitätskinderklinik behandelt wurden.

Eine Patientin wurde in der Tübinger Medizinischen Klinik behandelt.

Außerdem stellten sich gesunde Erwachsene freiwillig als

Versuchspersonen zur Verfügung.
Aus ethischen Gründen wurde auf eine Kontrollgruppe mit gesunden Kindern verzichtet.

2.6. Herstellung von Lösungen und Puffern

2.6.1 Herstellung der Lösungen

Die folgenden für den Enzymnachweis verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei -20°C aufbewahrt.

a) Die Lösung der bakteriellen alkalischen Phosphatase

Die bakterielle alkalische Phosphatase (BAP) wurde 15 Minuten bei 1200 Umdrehungen / Minute und 4 Grad zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde das Sediment mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 150 U/ml verdünnt.
Für die BAP / Trizma-Lösung wurden 500 µl BAP-Lösung in 100 µl 1 M Trizmalösung aufgelöst.

b) Die Creatinphosphokinaselösung

Von der Creatinphosphokinase wurden 30 mg abgewogen und in 100 µl 0,1 M Creatinphosphat, das zuvor in destilliertem Wasser aufgelöst worden war, gelöst.

c) Die Glycin-HCl - Lösung

Das Glycin wurde mit HCl und destilliertem Wasser unter ständigem Rühren und ständiger pH-Messung bis zu dem erwünschten pH-Wert von 2 und 1 molarer Konzentration verdünnt.
Die Aufbewahrung erfolgt bei 4 Grad.

d) Die ATP-Lösung

Mit ATP wurde durch Auflösung in destilliertem Wasser eine 84 mM Lösung hergestellt.

e) Die Poly (rI):(rC)-Lösung

1 mg Poly (rI):(rC) wurde jeweils in 1 ml destilliertem Wasser aufgelöst.

2.6.2 Herstellung der Puffer

Die angegebenen Reagenzien wurden in den notwendigen Mengen abgewogen und auf die nötigen Konzentrationen verdünnt.
Die Puffer wurden bei 4 Grad Celsius aufbewahrt.
Der radioaktive "Cocktail" wurde jeweils für die Menge der zu untersuchenden Proben angesetzt. Da pro Probe 10 µl dieser Reaktionsmischung benötigt werden, wurden z.B. für 50 Proben 600 µl angesetzt (s. Tabelle 1).

a)	Lysis-Puffer	5 mM	$MgCl_2$
		120 mM	KCl
		200 mM	HEPES
		7 mM	DTT
		10 %	Glycerol
		0,5 %	Nonidet P 40
b)	Puffer B	5 mM	$MgCl_2$
		50 mM	KCl
		10 mM	HEPES
		7 mM	DTT
		20 %	Glycerol
c)	Puffer C (= Puffer B, 5-fach konzentriert)	25 mM	$MgCl_2$
		250 mM	KCl
		50 mM	HEPES
		35 mM	DTT
		20 %	Glycerol

d) "Cocktail", radioaktiv:
(Angaben erfolgen in µl)

Puffer C	100	120	140	180
84 mM ATP	15	17,9	21	27
Poly(rI):(rC)	20	24	28	36
CPK-Lösung	50	60	70	90
radioaktives ATP	315	378	441	567
Gesamtmenge	500	600	700	900

2.6.3. Herstellung des Kulturmediums RPMI 1640

Für die Zellkulturen, v.a. Lymphocytenkulturen, wurde ein Medium angesetzt, das wie die Puffer bei 4°C aufbewahrt wurde.
Für 500 ml dieser RPMI-Variante benötigte man:

50 ml RPMI 1640
26 ml $NaHCO_3$
5 ml L-Glutamin
50 ml FKS

mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

3. Methoden

3.1. Die Herstellung von Extrakten aus menschlichen mononukleären weißen Blutzellen

Schritt 1
Proben von jeweils 2 ml heparinisiertem Venenblut wurden in Versuchsröhrchen 1:1 mit kalter PBS verdünnt, auf 3 ml Ficoll Hypaque geschichtet und 30 Minuten bei 400g zentrifugiert.
Die Zellen der Interphase wurden abgesaugt, zweimal in je 5 ml PBS gewaschen und im Coulter Counter gezählt.

Schritt 2
Jeweils 10^6 Zellen pro Milliliter wurden in 0,1 ml kaltem Lysis-Puffer suspendiert und unmittelbar darauf für 10 Sekunden auf dem Schüttler geschüttelt.
Nachdem die Zellsuspension für 6 Minuten bei 8000 g und -4°C zentrifugiert worden war, wurde der Überstand bis zur Durchführung des Versuchs (3.4) bei -70°C eingefroren.

3.2. Die Herstellung von Tumorzellextrakten nach Interferonstimulation

3.2.1. Die Kultivierung der Zellen

Die unter 2.3. genannten malignen Tumorzellinien wurden als Monolayer in Kulturflaschen in MEM mit Zusätzen kultiviert.
Die konstanten Inkubationsbedingungen waren 37°C und 5 % CO_2, die Luftfeuchtigkeit betrug 95 %.
Die Zellen wurden 1-2mal wöchentlich passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit ca. 1 ml 37°C warmem Trypsin behandelt.

Das Trypsin wurde bis zum Ablösen der Zellen belassen. Die abgelösten Zellen wurden in warmem Medium resuspendiert und neu ausgesät.
Das Kulturmedium wurde 2mal wöchentlich erneuert.
1 - 2 Tage vor dem jeweiligen Versuchsansatz wurden die Zellinien passagiert, um konstante Wachstumsbedingungen (Nährstoff, Raum) zu schaffen.

3.2.2. Die Interferonstimulation

Zellen aus den Kulturflaschen wurden auf eine Konzentration von $5 - 6 \times 10^5$/ml verdünnt und als Monolayer ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit IFN behandelt.

Die IFN-Konzentration variierte zwischen 100 und 5000 U/ml. Dafür wurden vor dem Versuch die benötigten IFN-Konzentrationen aus der gegebenen IFN-Verdünnung hergestellt.
Nach 10-120 Minuten Einwirkungszeit des IFN wurde die Mischung aus Medium und IFN abgesaugt und die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in MEM resuspendiert, nach 24 Stunden Inkubationszeit unter obengenannten Bedingungen mit Trypsin abgelöst (s.3.2.1.) und im Coulter Counter gezählt. Für die Dauerexposition wurden die Zellen nach der IFN-Zugabe 24 Stunden lang unter den oben genannten Bedingungen inkubiert, dann mit Trypsin abgelöst und im Coulter Counter gezählt.

3.2.3. Die Lyse der Zellen

Die Zellen wurden zweimal mit HBSS gewaschen, und anschließend erfolgte die Lyse wie unter 3.1., Schritt 2.

3.3. Die Stimulation von Lymphocyten mit Interferon

Aus 20 ml heparinisiertem Blut wurden die Lymphocyten mit Ficoll-Hypaque isoliert und zweimal mit PBS gewaschen.
Die Zellen wurden im Coulter Counter gezählt und auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml mit PBS gebracht.

Das aufgetaute IFN (β-IFN mit 10^5 IU/ml) wurde 1:10 bzw. 1:100 mit Ampuwa verdünnt, so daß Konzentrationen von 10^4 bzw. 10^3 U/ml vorlagen.

Nun wurden in die 6-Loch-Platten ausgesät:
Pro Loch
- 0,2 ml Zellflüssigkeit (das entsprach 0,2 x 10^6 Zellen)
- O,2 ml IFN (entweder in der Verdünnung von 10^4 oder von 10^3 U/ml) bzw. PBS für die Kontrolle
- 1,6 ml RPMI 1640

Damit war die Endkonzentration des IFN pro Loch jeweils 10^3 bzw. 10^2 U/ml.

Die Kulturplatten wurden 2 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen nach der unter 3.1. beschriebenen Methodik gewaschen, gezählt, lysiert und die Zellextrakte bei -70°C eingefroren.

3.4. Der Nachweis der 2-5 Synthetaseaktivität

I. Prinzip

Grundlage für die Gewinnung des Enzyms waren Agarosekügelchen, an die Poly (rI):(rC) gebunden war.
Mit diesen Kügelchen wurden die (aufgefrorenen) Zellextrakte (zur Herstellung dieser Extrakte s.3.1.)

gemischt. Dabei wurde das Enzym gebunden und das ungebundene verunreinigende Protein konnte ausgewaschen werden.
Um die Aktivität der in der einzelnen Probe vorhandenen Enzymmenge zu messen, wurden die Proben mit radioaktivem ATP inkubiert.
Aus diesem ATP synthetisierte das Enzym (radioaktiv markierte) Oligonukleotide, sogenannte 2-5 A Oligonukleotide, die mit bakterieller Phosphatase behandelt wurden.
Dabei entstanden dephosphorylierte 'cores'.
Um verbliebenes freies Phosphat zurückzuhalten, wurden kleine Aluminasäulen hergestellt, die das radioaktive Gemisch durchlaufen mußte.
Im Eluat konnten die 2-5 A Oligonukleotide aufgefangen werden.
Die Menge an 2-5 A und damit die Menge an aktivem Enzym konnte im Szintillationszähler indirekt über die vorhandene Radioaktivität in den einzelnen Proben gemessen werden.

II. Arbeitsschritte

Teil 1

Jeweils exakt 50 µl der Poly (rI):(rC) - Agarosekügelchen, die in einer Suspension, bestehend aus 0,2 M Natriumchlorid und 0,02 M Natriumphosphat, pH 7,5, vorlagen, und die vor Gebrauch immer wieder aufgeschüttelt werden mußten, wurden in numerierte Eppendorfhütchen pipettiert (nachdem vorher die Pipettenspitzen abgeschnitten worden waren) und in je 1 ml des Puffer B (s. 2.6.2 unter b)) suspendiert.
Nach zweiminütigem Zentrifugieren wurde der Überstand zunächst grob mit der Wasserstrahlpumpe, dann sorgfältig mit einem Ballon abgesaugt, bis alle Flüssigkeit entfernt war. Dabei durften keine Agarosekügelchen verloren gehen.

Die bei -70° Celsius eingefrorenen Proben mit den Zellextrakten (siehe 3.1.) wurden in Eisschalen aufgetaut, einschließlich zwei Proben eines gesunden Spenders (sog. Standardwert, zur Bestimmung dieses Wertes s. S.25).

Jede Probe wurde geschüttelt und jeweils 10 µl wurden auf die Agarosekügelchen in die Eppendorfhütchen pipettiert.
Dabei wurden alle Proben als Doppelwerte angesetzt, einschließlich der oben genannten Standardwerte und zweier Leerwerte, hier mit 'Background' bezeichnet, die außer Zellextrakt alle sonstigen Substanzen enthielten.
Anschließend wurden die Zellextrakte für eine eventuelle Wiederbestimmung eingefroren.

Das Gemisch aus Agarosekügelchen und Zellextrakt wurde geschüttelt und eine Minute zentrifugiert.
Anschließend erfolgte eine 15minütige Inkubation bei 30 Grad Celsius im Wasserbad.
Die Probeninhalte wurden mit jeweils 1 ml des Puffer B suspendiert, 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand (wieder mit Wasserstrahlpumpe und Ballon s. oben) sorgfältig abgesaugt.
Jede Probe wurde mit 10 µl des radioaktiven "Cocktails" (s. 2.6.2. unter d)) versetzt, 2 Minuten zentrifugiert (um die am Gefäßrand eventuell hängengebliebene Lösung ganz herunter zu zentrifugieren) und anschließend 20 Stunden bei 30 Grad Celsius im Wasserbad inkubiert.
(Nach dieser Inkubation konnten die Zellextrakte mit dem radioaktiven "Cocktail" eingefroren werden).

Teil 2

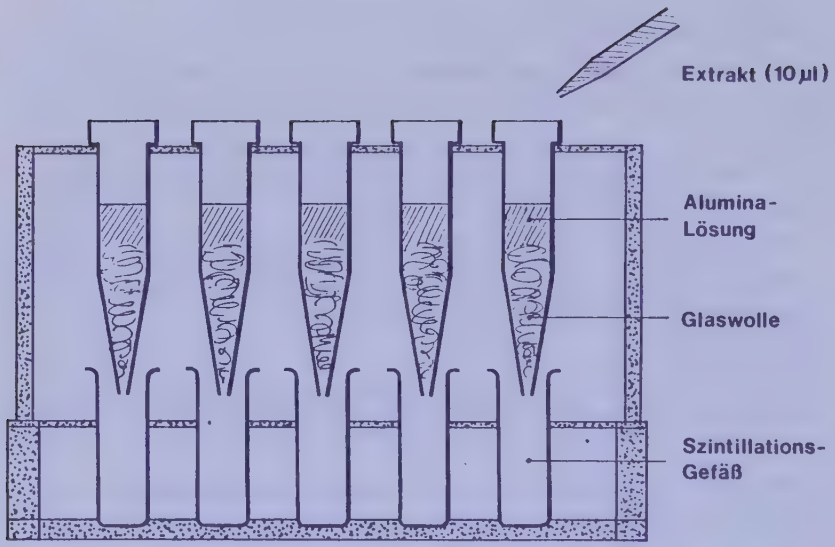
Für die Herstellung der Aluminasäulen wurden Pipettenspitzen locker mit Glaswolle gestopft und mit jeweils 1 ml destilliertem Wasser durchgespült.
Für 100 ml Aluminalösung wurde in einem Glasmeßzylinder

Alumina bis zur Marke '50 ml' eingefüllt und bis zur Marke '100 ml' destilliertes Wasser hinzugegossen.
Nach kräftigem Schütteln wurde der Meßzylinder nochmals auf '100 ml' mit destilliertem Wasser aufgefüllt und nun auf dem Magnetrührer gut gerührt, bis die Alumina-Wasser-Mischung homogen erschien.
Auf die Glaswolle in den Pipettenspitzen wurden 0,6 ml dieser Aluminalösung, die weiterhin auf dem Magnetrührer gerührt werden mußte, aufgetragen.

Die Aluminasäulen wurden mit jeweils 1 ml 1 m Glycin-HCl-Lösung pH 2 (s. 2.6.1. unter c)) gewaschen.

Die Proben im Wasserbad wurden nach der 20stündigen Inkubation mit je 10 µl der BAP-Lösung (s. 2.6.1. unter a)) versetzt.
Bei 37 Grad Celsius wurden die Proben 1 Stunde im Wasserbad inkubiert, nachdem sie kurz zentrifugiert und erneut geschüttelt worden waren.
Anschließend wurden die Proben mit 20 µl destilliertem Wasser verdünnt und wiederum geschüttelt.

Der Ständer mit den präparierten Aluminasäulen wurde auf die Szintillationsgefäße gestellt, so daß jede Aluminasäule in "ihr" Szintillationsgefäß hineinragte (vgl. Abb. 5).



Versuchsanordnung für die Elution der 2-5 A (Seitansicht)

Abb. 5

Aus dem Überstand in den Proben wurden nach der einstündigen Inkubation 10 µl auf die Aluminasäulen pipettiert, wobei darauf geachtet werden mußte, daß der Extrakt direkt auf die Aluminaschicht zu liegen kam.
Anschließend wurden die Säulen dreimal mit je 1 ml der 1 M Glycin-HCl-Lösung pH 2 gewaschen, wobei ein Überlaufen der Säulen vermieden werden mußte.
Um den radioaktiven Input zu messen, wurden aus dem Überstand des 'Background' 10 µl in 3 ml 1 M Glycin-HCL-Lösung pH 2 pipettiert, ohne ihn zuvor über eine Säule

laufen zu lassen.
Die Szintillationsgefäße wurden mit numerierten Deckeln versehen.
Die Messung der eingebauten Radioaktivität erfolgte im Szintillationszähler durch Bestimmung der Cerenkov-Strahlung im H3-Kanal.

Teil 3

Für die Auswertung wurden die Doppelwerte zunächst gemittelt.
Von dem errechneten Mittelwert wurde dann der 'Background' subtrahiert.
Da die absoluten Enzymaktivitäten je nach experimentellen Bedingungen von Versuchsreihe zu Versuchsreihe schwankten, wurden die Enzymaktivitäten nicht in 'counts per minute' (cpm) angegeben, sondern relativ zum definierten Standardwert = 1 ausgedrückt, der bei jedem Versuch mitlief.
Zur Bestimmung des Standardwertes wurde die Enzymaktivität bei 6 gesunden Erwachsenen gemessen.
Dazu wurden in einer Versuchsreihe aus den Doppelwerten der Mittelwert (abzüglich des Backgrounds) bestimmt.
Aus diesen Werten wurde der Mittelwert gebildet (vgl. Tab.I).

Tab. I:
Enzymaktivität bei gesunden Erwachsenen (Gruppe I) zur Bestimmung des Standardwertes

n	Mittelwert (in cpm)
1	2901 $\pm$ 456
2	5195 $\pm$ 301
3	1472 $\pm$ 234
4	2466 $\pm$ 166
5	2750 $\pm$ 388
6	4295 $\pm$ 698
Mittelwert:	3179 $\pm$ 1341

Ein Spender (n=1), dessen Wert am ehesten im Bereich des Mittelwertes lag, wurde zum Vergleich für alle folgenden Versuchsreihen herangezogen:
Von ihm wurde Zellextrakt (gewonnen aus ein und derselben Blutmenge, mit der auch die Ermittlung des Standardwertes durchgeführt worden war) in Einzelportionen eingefroren.
Die Werte dieses Spenders gingen als Standardwert in jede Versuchsreihe ein.

Beispiel zur Berechnung der Werte:

1. Wert	2985 cpm	
2. Wert	2634 cpm	
Mittelwert	2809 cpm	
- Background	440 cpm	
	2369 cpm	
Standard	1022 cpm	

$$\frac{\text{Meßwert}}{\text{Standard}} = \frac{2369 \text{ cpm}}{1022 \text{ cpm}} = 2{,}32$$

Der Input, d.h. die zugegebene Radioaktivität, lag je nach Zeitpunkt der Verwendung des radioaktiven ATPs, das eine Halbwertszeit von 14 Tagen hat, zwischen 1.000.000 und 100.000 cpm.

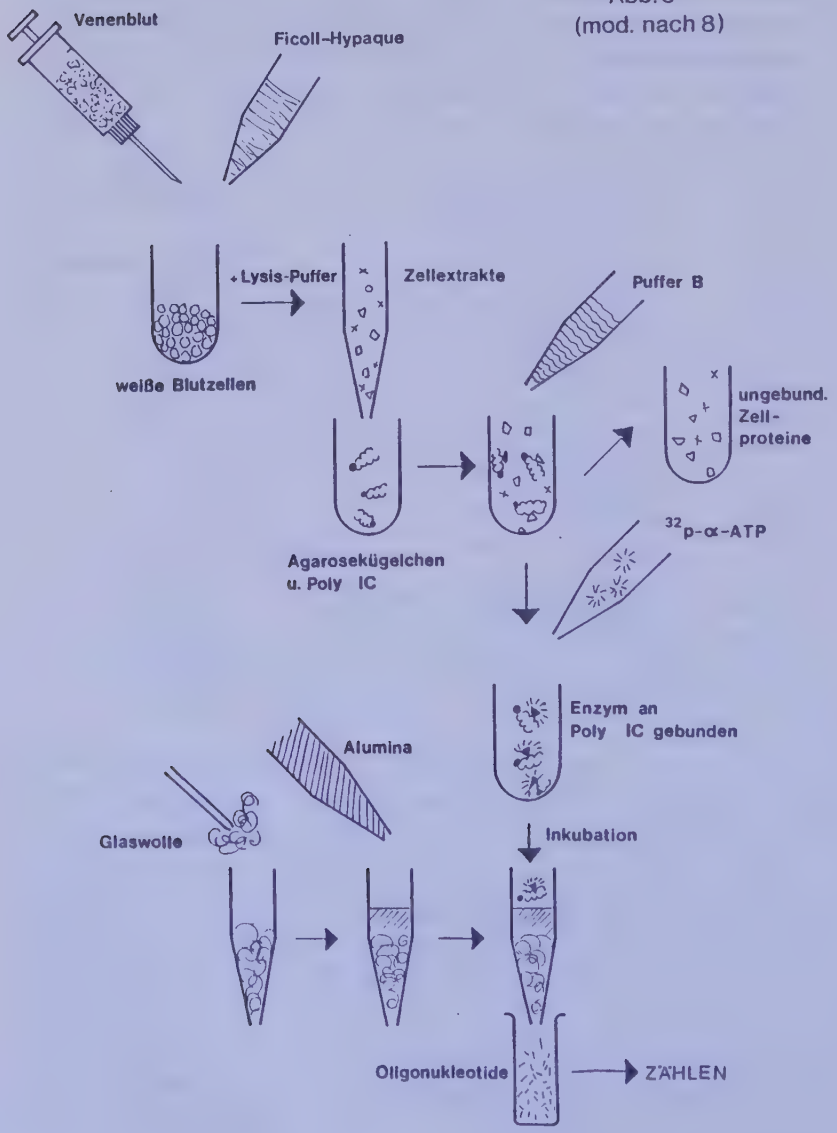
Neben den individuellen Schwankungen der Werte sind Schwankungen auch auf die Methode zurückzuführen. Kritische Punkte waren vor allem der gelegentlich hohe Background. Mögliche Ursachen dafür können sein: die bakterielle alkalische Phosphatase war nicht genügend aktiv, oder die Säulen waren nicht optimal mit Glaswolle gepackt, so daß Aluminamaterial im Eluat erschien.
Die Ergebnisse mit hohem Background wurden verworfen, und der Versuch wurde mit frischer bakterieller Phosphatase wiederholt.

Um die Streuung der (jeweils aus einer Probe gewonnenen) Doppelwerte zu veranschaulichen, sind nachstehend die Ergebnisse von 13 Proben einer Versuchsreihe aufgelistet (in Mittelwerten mit Standardabweichung, abgekürzt mit S.D.).
Außerdem wurden die Ergebnisse den Gruppen (vgl. Kapitel 4) zugeordnet:

Nr.	Mittelwerte mit S.D. (in cpm)	Gruppe
1	3713,0 ± 456	Standardwert
2	5609,5 ± 2110	II
3	2953,0 ± 1180	II
4	8793,0 ± 3719	III
5	6119,0 ± 1830	III
6	2202,5 ± 770	V
7	2785,0 ± 1085	VI
8	3028,5 ± 489	VI
9	3272,0 ± 219	VI
10	2953,5 ± 1180	VII
11	4086,5 ± 321	VIII
12	16457,5 ± 9124	VIII
13	20172,5 ± 3799	VIII

Zusammenfassend für den Ablauf der einzelnen Versuchsschritte die schematische Darstellung in Abb. 6.

Abb. 6
(mod. nach 8)



4. Ergebnisse

Mit der dargestellten Methodik konnte der Nachweis der enzymatischen Aktivität der 2-5 Synthetase mit relativ geringen Mengen an Zellextrakt erfolgen.
Es genügten für die Enzymbestimmung 1-2 ml peripheres Venenblut bzw. 5×10^5 Zellen aus Zellkulturen.

4.1. Die 2-5 Synthetase in menschlichen Lymphocyten

Für die Auswertung der Versuche sind zwei mathematische Parameter verwendet worden:

1. Mittelwert: $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} x_i$

2. Standardabweichung: $s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}$

4.1.1. Die 2-5 Synthetase in Lymphocyten von Versuchspersonen ohne Infekte oder Tumorerkrankungen

Menschliche weiße mononukleäre Blutzellen, bestehend v.a. aus Lymphocyten, Makrophagen und Monocyten und im folgenden mit 'Lymphocyten' summarisch abgekürzt, hatten bereits ohne IFN-Stimulation relativ hohe Enzymspiegel.
Sie lagen durchschnittlich 4-5fach höher als die der untersuchten Extrakte aus Kontrollzellen der Tumorzellkulturen.

In der Gruppe II (vgl. Tab. II) sind die Ergebnisse von Kindern ohne Infekte und ohne Tumorerkrankungen zusammengefaßt.

Tab. II: Gruppe II (Kinder ohne Infekte und Tumorerkrankungen)

n	Geburts-datum	Wert	Bemerkungen
1	06.07.79	0,43	Fallot
2	13.03.70	1,40	idiopath.Thrombocytopenie, 26000 Thrombos
3	05.05.68	1,02	Minderwuchs
4	15.12.73	1,79	Z.n. Tegretalüberdosierung und Alkohol
5	17.05.77	1,10	AV Kanal mit LI-Re-Shunt
6	15.09.72	0,81	Mosaik-Turner.Syndrom, M.Crohn mit Befall des Colons
7	23.04.72	0,58	Anfallsleiden, psychomot.Retardierung
8	08.02.77	1,02	Penicillinallergie, Exanthem. kein Fieber
9	27.11.75	1,00	mesangioproliferative GN, intest. Lymphangiektasie
10	07.01.72	0,69	Hydrocephalus internus, wiederholte Ventilrevisionen
11	27.04.74	1,14	V.a.Grandmal-Anfälle
12	07.11.75	0,35	Mitralinsuff., pulmonale Hypertonie

n	Geburts-datum	Wert	Bemerkungen
13	31.08.79	0,42	Krampfanfall nach Sonneneinstrahlung und Nahrungskarenz, Hypoglykämie
14	11.09.64	1,76	therapieres. T3 Hyperthyreose seit 2 J.
15	22.08.79	0,63	chron.Erbrechen, "gestörte Mutter-Kind-Beziehung"
16	13.01.71	0,93	nephrot.Syndrom
17	11.05.79	0,95	Vitium cordis, Hepatosplenomegalie, erhöhte BSG unklarer Genese
18	26.03.73	0,88	Enuresis nocturna ohne Organbefund
19	22.12.69	0,27	Anfallsleiden mit Blinzeltics
20	17.09.65	0,62	Diab.insipidus ohne org.Ursache
21	17.06.64	1,07	AGS
22	08.12.68	0,80	Grandmal und partiale Anfälle
23	28.03.70	1,00	Parese der Nerven 6,7,8,9, Spastik li, Arm und Bein, kein Hinweis auf Tumor
24	22.09.68	1,56	Hypoglossusparese li, Horner li, vermutl. connatal
25	08.01.79	0,36	Blinzelattacken, Myoklonien
26	18.06.67	0,96	li Krampfsymptomatik nach Trauma, hämorrh. Infarkt im Endstromgebiet zw. Ant. und Mediaversorgung
27	14.05.73	2,34	Unfall, Liquorrhoe, Mesenterialwurzeleinriß
28	19.02.72	1,23	per.Facialisparese, am Entlassungstag
29	02.04.72	2,00	Asthma bronchiale

Bei dieser Gruppe lag der Mittelwert bei 0,76 und die Standardabweichung bei $\pm$ 0,64 (n=29).
Als Kontrollgruppe ist diese Gruppe nur sehr bedingt heranzuziehen, da die Kinder krank waren und zu einem großen Teil unter Therapie waren. Es ist anzumerken, daß aus ethischen Gründen keine gesunden Kinder in diese Versuchsreihe miteinbezogen wurden.

Neben starken individuellen Schwankungen waren auch die intraindividuellen Schwankungen ganz erheblich. So lagen z.B. bei einer Versuchsperson die im Verlauf von 3 Wochen wiederholt bestimmten Werte zwischen 0,86 (0,48 bzw. 1,23) und 1,58 (1,68 bzw. 1,47), ohne daß sie an einem Infekt oder Ähnlichem erkrankte.

4.1.2. Die 2-5 Synthetase während bakterieller und viraler Infektionen

Nachfolgend sind die Ergebnisse aufgeführt, die die Lymphocytenuntersuchungen von Kindern ergaben, die an bakteriellen oder viralen Infekten erkrankt waren. Für beide Gruppen ergaben sich im Vergleich zu den obengenannter Vergleichsgruppen erhöhte Werte.

Die Gruppe III (vgl. Tab. III) mit den an bakteriellen Infekten erkrankten Kindern hatte leicht erhöhte Enzymwerte. Der Mittelwert lag bei 3,41 und die Standardabweichung bei $\pm$ 2,24 (n=18).

Tab. III: Gruppe III (Kinder mit Verdacht auf bakterielle Infekte)

n	Geburts-datum	Wert	Bemerkungen
1	06.07.69	4,37	Otitis media re, Angina, Fieber im Rachenabstrich: E.coli
2	05.04.64	4,72	gerötete Trommelfelle, Kieferwinkellymphome
3	22.06.80	3,56	Infekt, Fieber, 5 Tage nach op
4	28.12.75	3,64	4 Wochen nach fieberhaftem Infekt Mykoplasmentiter: 10 Yersinia: 1:40
5	29.04.73	8,83	4 Wochen nach hochfieberhaftem Infekt Mykoplasmentiter: 80 Yersinia: 1:320
6	20.11.72	1,83	offene Lungentuberkulose
7	12.10.69	{10,67}	V.a. Harnwegsinfekte, rezid. Durchfälle
8	20.04.73	{ 0,33}	destruierende Coxitis tub. re (seit 3 Jahren)
9	11.01.78	1,26	fulminante Meningokokkensepsis mit Verbrauchskoagulopathie
10	03.08.74	3,88	Bronchopneumonie, Fieber, Spucken, Durchfall
11	26.06.69	1,40	Stammganglienherdencephalitis, Tetraspastik zwischenzeitlich Mykoplasmentiter erhöht
12	20.11.67	4,32	Appendicitis, kurz vor Appendektomie
13	27.03.76	3,84	Husten und Heiserkeit (Grundkrankheit: AGS)
14	07.09.79	3,13	Meningokokkenmeningitis, Pneumonie, Otitis media, kein Fieber
15	20.06.75	0,54	Pneumonie, Mukotympanon bds., kein Fieber 2 Tage vor Entlassung
16	07.04.79	2,75	Otitis media li (unklare Schwellung para- und retrosternal, kein Hinweis für Osteomyelitis oder Tumor)
17	17.01.71	0,92	Pneumonie, kein Fieber
18	18.07.74	6,66	eitrige Tonsillitis (häm.Streptokokken)

Sehr viel höher lagen die Enzymwerte in der Gruppe IV (vgl. Tab. IV) mit den Kindern, bei denen der Verdacht auf virale Infektionen vorlag.
Hier fand sich ein Mittelwert von 21,72 und eine Standardabweichung von ± 14,12 (n=5).

Tab. IV: Gruppe IV (Kinder mit Verdacht auf virale Infekte)

n	Geburts-datum	Wert	Bemerkungen
1	20.12.74	27,44	40 Grad Fieber, Lymphadenitis colli Lymphocyten: 67 %
2	18.01.72	5,52	2 Tage nach Aufnahme: M. Pfeiffer Lymphocyten: 87 %
		1,71→	bei Entlassung
3	27.07.79	8,93	seit 14 Tagen nichtfieberhafter Infekt der oberen Luftwege, weder V.a. Keuchhusten noch TB bestätigt Lymphocyten: 85 %
4	24.10.80	27,51	Virusinfekt mit meningealer Reizung, 40 Grad Fieber, Liquor steril Lymphocyten: 75 %
5	11.12.66	39,19	Fieber im Rahmen einer Virusinfektion, Encephalitis diss., 2jähr. Verlauf mit rezidivierenden neurologischen Symptomen Lymphocyten: 23 %

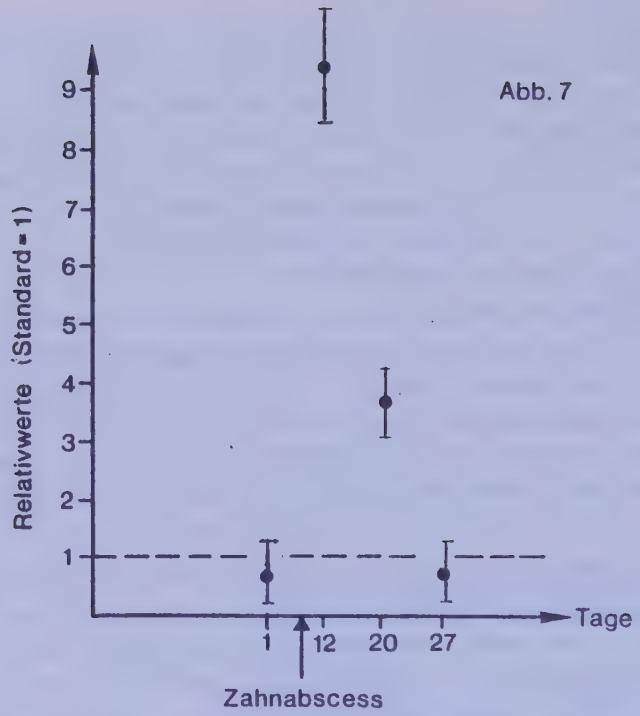
Diese zwei letztgenannten Gruppen sind sehr heterogen. Da nur zu einem geringen Prozentsatz ein Erregernachweis durchgeführt wurde, war eine Zuordnung z.T. nicht eindeutig möglich.
Obwohl der Zeitpunkt der Blutabnahme immer morgens erfolgte und damit konstant war und auch die Aufarbeitung des Blutes immer unmittelbar danach erfolgte, lassen sich die Werte insbesondere deshalb schlecht vergleichen, weil die Krankheitsstadien unterschiedlich waren.

Bei einem 9jährigen Jungen (s. Tab. IV, Kind Nr. 2) mit Mononukleose hatte der Enzymwert während der floriden Erkrankung mit 5,52 (die Doppelwerte waren hier 5,25 bzw. 5,79) einen dreifach höheren Wert als nach der Genesung: bei der Entlassung nach 9 Tagen lag der Enzymwert bei 1,71 (1,69 bzw. 1,74) und somit fast wieder im Wertbereich der Kontrollgruppe II.

Auch Kinder mit Erkrankungen, bei denen sich noch Infektionen aufgepfropft hatten, hatten erhöhte Enzymspiegel: Bei einem 13jährigen Kind mit einer akuten lymphatischen Leukämie und einem 16jährigen Mädchen nach der Therapie eines malignen embryonalen Teratoms (zum Zeitpunkt der Enzymbestimmung rezidivfrei) waren die Enzymwerte wegen Infektionen 17- bzw. 12fach erhöht.

Bei einem 6jährigen Jungen mit einer neurologischen Grunderkrankung mit klonisch-tonischen Krämpfen konnte das Auftreten eines Zahnabszesses anhand wiederholter Enzymbestimmungen in seinem Verlauf verfolgt werden.

Dabei stieg der Enzymwert während der Erkrankung auf das 12fache des Standardwertes und fiel wieder in den Bereich der Kontrollgruppen ab (vgl. Abb. 7).



Zu Abb. 7: Verlauf der Enzymaktivität bei einem Jungen während des Auftretens eines Zahnabscesses.

4.1.3. Die 2-5 Synthetase bei Kindern mit malignen hämatologischen und Tumorerkrankungen

Die Patienten mit malignen Erkrankungen wurden in verschiedene Gruppen eingeteilt:
Die Gruppe V beinhaltet die Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie vor Therapie.
Für diese Gruppe V (vgl. Tab. V) ergab sich ein Mittelwert von 0,70, wobei der Wert eines Kindes (Nr.2) eliminiert wurde, da der Verdacht auf einen Infekt bestand.
Der Mittelwert liegt unter dem Normbereich, d.h. der Werte der Gruppe II. Es ist anzumerken, daß die Hälfte der Kinder der Gruppe V mit dem ungefähr

0,3fachen des Standardwertes besonders niedrig lagen.

Tab. V: Gruppe V (Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie, vor Therapie)

n.	Geburts-datum	Wert	Differentialblutbild (%)
1	17.01.67	0,34	Seg 7, Ly 65 (grosser Milztumor, diffuse Skelettbeteiligung)
2	05.03.68	{3,31}	St4, Seg20, Ly38, Mo3, My1, Eo2
3	17.02.72	0,25	St7, Seg40, Ly44
4	10.08.72	0,35	Seg5, Ly44, Mo1 (nur 50 Zellen gezählt)
5	11.07.70	0,64	Eo1, My1, J2, St2, Seg5, Ly18
6	09.11.76	1,29	Seg3, Mo3, Ly56, path.Zellen 38

Für die Gruppe VI, die Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie unter Therapie (vgl. Tab. VI) lag der Mittelwert mit 1,32 etwas höher als die Mittelwerte der Vergleichsgruppe II.

Tab. VI: Gruppe VI (Kinder mit ALL unter Therapie)			
n	Geburts-datum	Wert	Differentialblutbild (%)
1	16.08.68	0,26	Seg1,Ly99 (Pleurerguss)
2	22.06.65	4,82	St1, Seg53, Ly46 (Rezidiv)
3	19.10.75	0,66	Seg85, Ly13, Mo2
4	09.02.68	0,48	Ba1, Eo3, Seg33, Ly61, Mo2 (Rezidiv)
5	24.05.77	0,39	Eo1, Seg6, Ly92, Mo1 (Meningiosisrezidiv)
6	18.07.71	2,32	St1, Seg32, Ly37 (Vollremission)
7	15.06.64	3,38	Seg72, Ly27, Mo1 (Vollremission)
8	18.11.78	0,62	Ba2, Seg50, Ly37, Eo6, Mo5 (Vollremission)
9	30.12.77	0,82	J2, St5, Seg22, Ly55, Mo8 (Vollremission)
10	01.06.67	0,38	Ba1, Eo1, Seg72, Ly25, Mo1 (Vollremission)
11	15.05.66	0,46	Eo1, Seg36, Ly59, Mo4 (Vollremission)

In der Gruppe VI fallen 3 Patienten heraus mit deutlich höheren Werten. Dazu muß im einzelnen angemerkt werden: Beim Kind mit der Nr. 2 liegt der Wert für einen Extrakt aus Knochenmarkszellen vor, während ein Wert für periphere Zellen 3 Wochen später mit 0,17 weit unter dem Standardwert war (nicht aufgeführt).
Der Patient mit der Nr. 6 hatte am Tag der Blutabnahme eine kleine Ulceration an der Unterlippe, die eventuell viral bedingt war. Das Kind mit der Nr. 7 hatte eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (41/60 n.W.).

Die letzten zwei Gruppen fassen die Kinder mit malignen Tumorerkrankungen vor und unter Therapie zusammen. (vgl. Tab. VII und VIII)

Tab. VII: Gruppe VII (Kinder mit malignen Tumorerkrankungen vor Therapie)			
Krankheit	n	Geburts-datum	Wert
M.Hodgkin	1	13.12.77	1,83
	2	30.06.67	5,32
malignes Histiocytom	3	19.04.80	0,58
Wilmstumor	4	11.04.73	0,30
akute myel.Leukämie	5		0,73

Tab. VIII: Gruppe VIII (Kinder mit malignen Tumorerkrankungen unter Therapie)			
Krankheit	n	Geburts-datum	Wert
Rhabdomyosarkom	1	15.09.72	4,13
	2	29.04.76	0,65
	3	07.05.75	1,45
	4	25.06.65	5,23
Osteosarkom	5	07.04.66	6,72
	6	02.01.67	1,28
	7	14.11.73	0,19
	8	19.11.72	2,34
Neuroblastom	9	28.10.78	15,59
	10	30.07.69	1,99
	11	05.12.78	2,23
	12	02.01.73	7,21
Synovialiom	13	09.01.70	14,02
Retinoblastom	14	22.08.77	0,59
Wilmstumor	15	24.03.76	1,46
abdominelles Nonhodgkinlymphom	16	18.01.75	1,47
Meningeom	17	28.01.71	4,93
Astrocytom	18	24.08.71	0,61
eosinophiles Granulom	19	12.08.63	1,47

Für die Gruppe VII (Tumorerkrankungen vor Therapie) ergab sich ein leicht erhöhter Mittelwert von 1,75 (n=5).

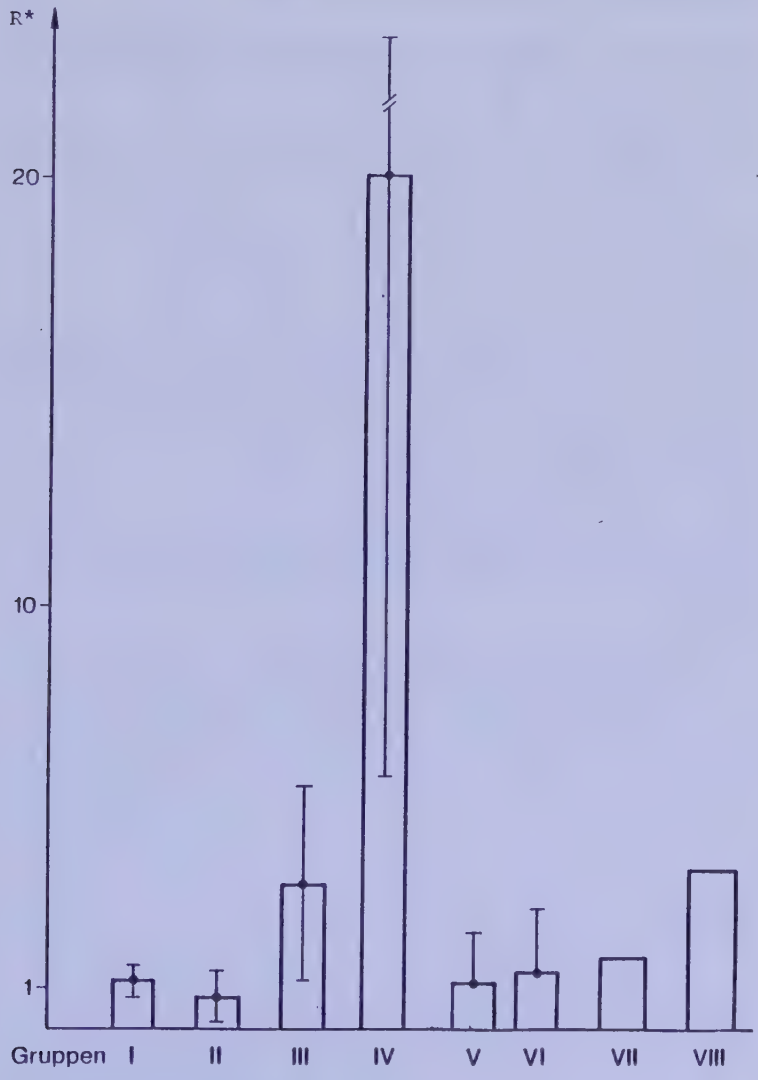
Deutlich höhere Werte lagen in der Gruppe VIII (Tumorerkrankungen unter Therapie) vor. Der Mittelwert lag bei 3,87 (n=19).
Auch hier fallen einige Werte besonders aus der Reihe: Das 2. Kind der Gruppe mit einem M.Hodgkin hatte einige Monate vor Beginn dieser Krankheit eine Meningoencephalitis mit Facialisparese durchgemacht; es konnte damals Coxsackievirus nachgewiesen werden. Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit hatte sich seither nicht mehr normalisiert.
Auch für zwei Kinder der Gruppe VIII müssen weitere Bemerkungen gemacht werden.
Das Kind mit Nr. 9 mit Neuroblastom hatte zum Zeitpunkt der Synthetasebestimmung extrem erniedrigte Leukocyten im Blutbild (680).

Beim Kind mit der Nummer 13 lag ein Synovialom am Unterarm vor. Es konnten klinisch keine Entzündungszeichen festgestellt werden, aber die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit war mit 56/85 zum gleichen Zeitpunkt wie die Synthetasebestimmung erhöht.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß in diesen Gruppen die Schwankungsbreite der Werte sehr hoch war.
Über mögliche Ursachen wird in der Diskussion näher eingegangen.

Eine zusammenfassende graphische Darstellung der untersuchten Gruppen findet sich in der Abb. 8.

Abb. 8 Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Gruppen I-VIII



* Relativwerte der Synthetaseaktivität

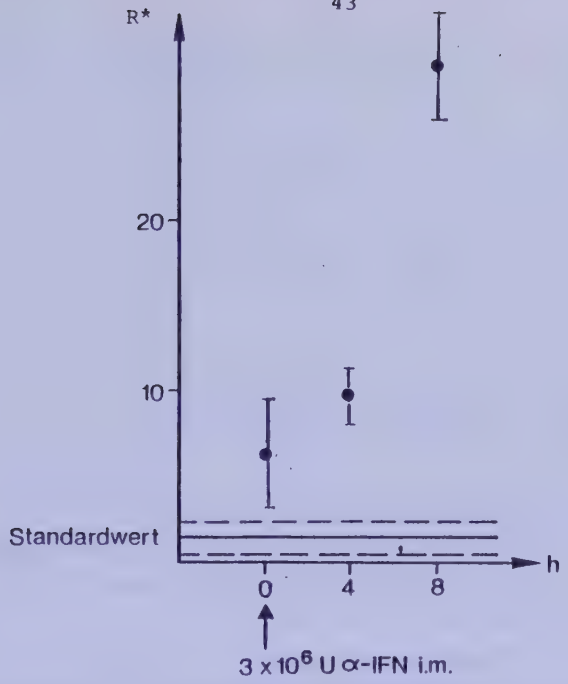
4.1.4. Der 2-5 Synthetaseanstieg unter IFN-Therapie

Bei zwei Patienten wurde der zeitliche Verlauf des Enzymanstiegs nach IFN-Gabe bestimmt:

Ein 6jähriger Junge mit Larynxpapillom bekam zunächst für 1 1/2 Monate täglich, dann in größeren Abständen 3mal wöchentlich IFN.
Die Bestimmung der Synthetaseaktivität fiel in den Zeitraum der diskontinuierlichen IFN-Applikationen.

Der Junge erhielt 3×10^6 U α-IFN intramuskulär.
Kurz vor der Injektion wurde Blut abgenommen (Stunde O), dann 4 und 8 Stunden nach IFN-Gabe.
In Abb. 9 sieht man, daß der Ausgangswert mit dem 6fachen des Standardwertes bereits relativ hoch lag. (Der Standardwert ist durch eine dicke ununterbrochene Linie, die Standardabweichung der Kontrollgruppe ist durch gestrichelte Linien angedeutet).
Nach 4 Stunden war die Synthetase auf das 1,4fache, nach 8 Stunden auf das 4,3fache des Ausgangswertes gestiegen.

Abb. 9



Zu Abb. 9: Anstieg der Enzymaktivität bei einem Jungen mit Larynxpapillom nach einer IFN-Injektion

Eine 23jährige Patientin mit Melanom erhielt in 24stündiger Infusion insgesamt 2,5 x 10^7 U β-IFN. Nach 30 Stunden war die Synthetase 8,3fach so hoch wie der Ausgangswert, der mit dem 0,7fachen des Standardwertes im Bereich der Kontrollgruppe II lag.
(vgl. Abb. 10)

* Relativwerte der Synthetaseaktivität

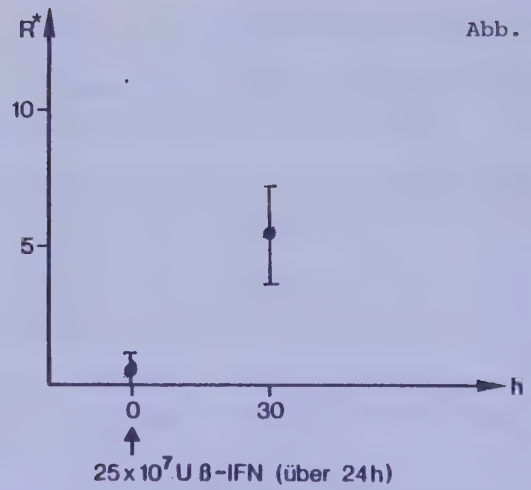


Abb. 10

Zu Abb. 10: Anstieg der Enzymaktivität bei einer Patientin mit Melanom nach einer 24stündigen IFN-Gabe

Zwei weitere Patienten standen unter IFN-Therapie:

Ein 14jähriger Junge mit osteogenem Sarkom, dessen Enzymwert 14fach so hoch war wie der Standardwert und nach Absetzen der IFN-Therapie in den Wertebereich der Kontrollgruppen abgefallen war, und ein 15jähriger Junge, mit einem Morbus Hodgkin, bei dem es unter der cytostatischen Behandlung zum Auftreten eines Herpes zoster gekommen war. Er wurde mit 6×10^6 U α-IFN zweimal täglich behandelt und hatte einen Enzymspiegel, der 12fach so hoch war wie der Standardwert.
Leider liegen für diese beiden Patienten keine Ausgangswerte vor.

* Relativwerte der Synthetaseaktivität

4.2. Der 2-5 Synthetaseanstieg nach IFN-Stimulation in vitro

4.2.1. Der Enzymanstieg nach IFN-Gabe in Lymphocyten

Aus peripherem Venenblut eines gesunden Spenders wurden zweimal Lymphocyten isoliert und in Kultur gebracht (zur Methodik s. 3.3.).
Bereits ohne IFN-Stimulation konnte bei beiden Versuchen ein basaler Enzymspiegel nachgewiesen werden.
Unter Stimulation mit β-IFN zeigte sich nach 20stündiger Inkubation ein konzentrationsabhängiger Enzymanstieg:
Beim ersten Mal (vgl. Abb. 11)

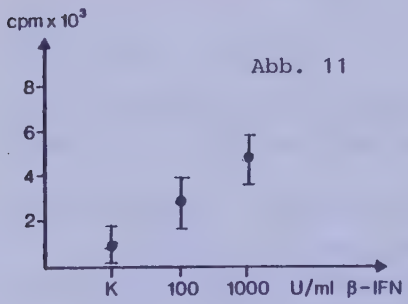
ein Anstieg auf das 3,5fache bei 100 U/ml β-IFN
und auf das 5,0fache bei 1000 U/ml β-IFN

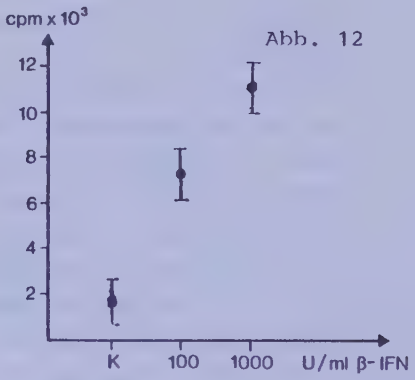
beim zweiten Mal (vgl. Abb. 12),

ein Anstieg auf das 4fache bei 100 U/ml β-IFN
und auf das 6fache bei 1000 U/ml β-IFN,

jeweils bezogen auf den Ausgangswert.

Abb. 11 und Abb. 12
Der 2-5 Synthetaseanstieg unter IFN-Stimulation
(in Lymphocyten)





4.2.2. Die Stimulation von Tumorzellen mit verschiedenen Interferontypen

Jeweils 5 x 10^5 Zellen dreier verschiedener Tumorzelllinien (CCL 127, SAOS-2 und SK-N-FJ) wurden für 24 Stunden mit verschiedenen IFN-Typen inkubiert: mit α-IFN, zwei verschiedenen Chargen von β-IFN (β_L und β_K) und γ-IFN (zur Methodik s. 3.2.2. unter 'Dauerexposition').

Die Endkonzentrationen lagen für alle drei IFN-Typen bei 100 U/ml.

Als Vergleichswerte wurden für jede Zellinie ein Kontrollwert (ohne IFN) und eine Art 'Leerwert' mit Mock-IFN (Endkonzentration 1000 ME/ml) als Doppelwerte angesetzt.

Abb. 13 gibt die Ergebnisse wieder:

1. Bereits ohne IFN-Stimulation konnte eine niedrige basale Aktivität der 2-5 Synthetase nachgewiesen werden. Sie lag zwischen dem 0,3- und 0,4fachen des

Standardwertes.

2. β-IFN war bei allen drei Zellinien wirksamer als α-IFN und γ-IFN. Die zwei Chargen zeigten geringe Aktivitätsunterschiede.
3. γ-IFN war weniger wirksam als α- und β-IFN. Nur die Stimulation der SK-N-FJ mit γ-IFN ergab höhere Spiegel als mit Stimulation mit α-IFN.
4. Mock-IFN bewirkte keinen, bzw. bei SAOS-2 einen leichten Enzymanstieg.

Für einen Vergleich der Enzymanstiege relativ zu den Ausgangswerten, d.h. den Kontrollwerten, s. Tab. 2.

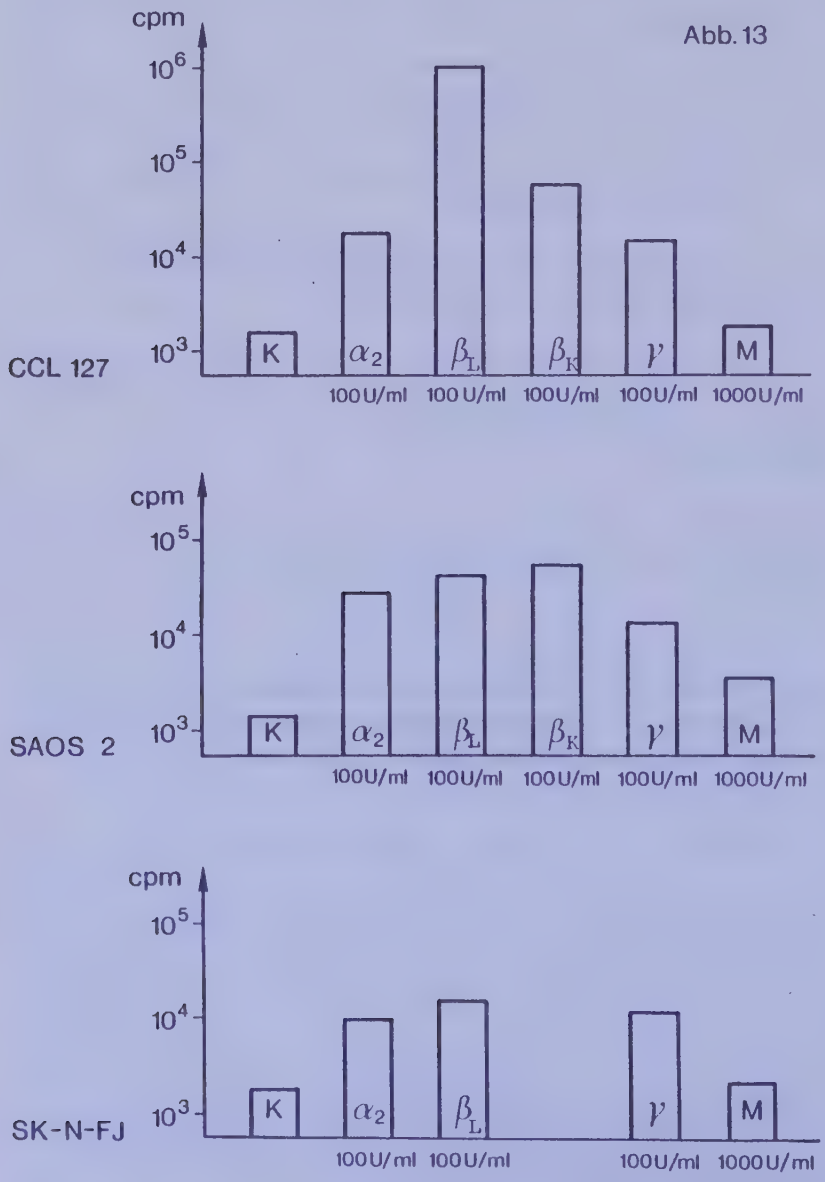
Tab. 2 Stimulation von Tumorzellen mit verschiedenen IFN-Typen (M=Mock-IFN)

Zelltyp	K	α	β_L	β_K	γ	M
CCL 127	1	10,5(±0,49)	48,9(±0,35)	36(-)	9,2(±0,42)	1,1(±0,07)
SAOS-2	1	20,6(±4,03)	29,5(±7,70)	38(-)	12,5(-)	3,1(-)
SK-N-FJ	1	4,0(-)	10,0(-)		6,5(-)	1,6(-)

In Klammern sind die Standardabweichungen der Doppelwerte angegeben. Z.T. konnte nur ein Wert ermittelt werden, da zu wenig Zellextrakt vorlag.

Die Stimulation von Tumorzellen mit verschiedenen JFN - Typen

Abb. 13



4.2.3. Die Enzymaktivität in Tumorzellextrakten in Abhängigkeit von Interferonkonzentration und Zeit

Vier Tumorzellinien (CCL 127, RD, SK-N-FJ und SAOS-2) wurden mit verschiedenen β-IFN-Konzentrationen behandelt und der Enzymanstieg auf Abhängigkeit von IFN-Konzentration und Zeit hin untersucht (zur Methodik s. 3.2.).

4.2.3.1. Der Enzymanstieg in Abhängigkeit von der Zeit

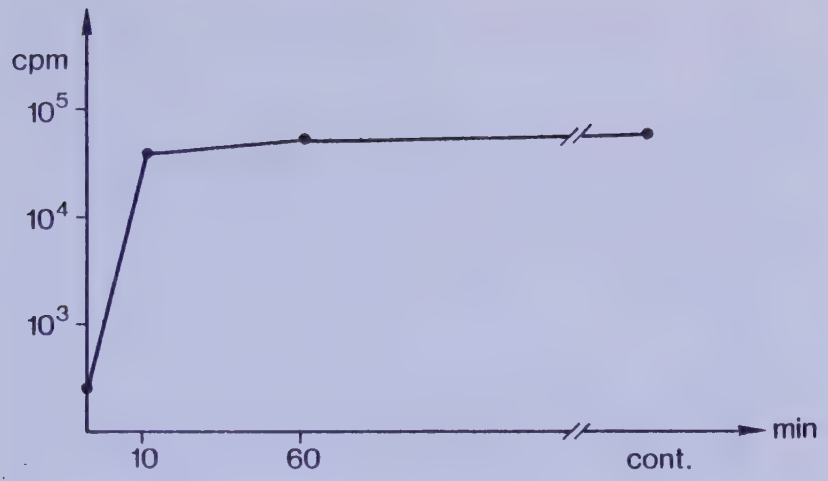
Alle untersuchten Tumorzellinien hatten bereits ohne IFN-Stimulation niedrige, aber nachweisbare Enzymspiegel: relativ zum Standardwert ergab sich für:

CCL 127	0,36	(± 0,28)
RD	0,14	(± 0,148)
SK-N-FJ	0,28	(± 0,01)
SAOS-2	1,05	(± 0,23)

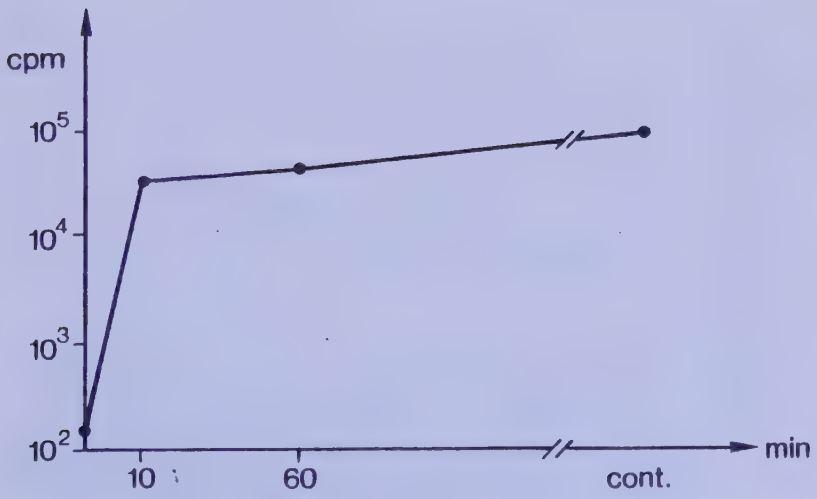
Für die Enzymanstiege mit der Zeit ergaben sich für die Zellinien unterschiedliche Ergebnisse:

1. Zwei bezüglich der Wachstumshemmung durch IFN relativ IFN-unempfindliche Zellinien, CCL 127 und RD, zeigten bereits nach 10 Minuten einen steilen Anstieg der 2-5 Synthetase. Die IFN-Konzentration lag für CCL 127 bei 5000 U/ml, für RD bei 1000 U/ml). Während einer Dauerexposition von 24 Stunden änderte sich die Enzymaktivität nicht mehr wesentlich. (vgl. Abb. 14 + 15)
2. Eine relativ IFN-empfindliche Zellinie, SK-N-FJ, zeigte bei niedrigerer IFN-Konzentration von 500 U/ml einen ähnlich raschen Enzymanstieg. Auch hier stieg das Enzym unter Dauerexposition nicht mehr wesentlich weiter an. (vgl. Abb. 16)

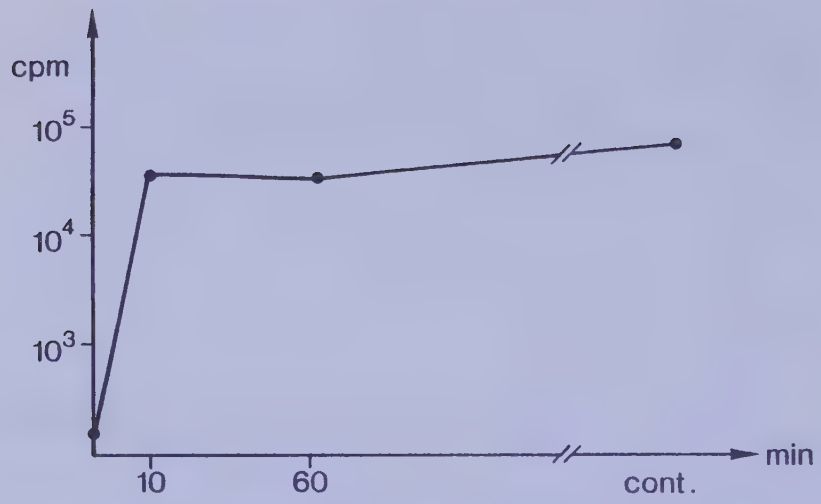
3. SAOS-2, auch eine empfindliche Zellinie, zeigte im Gegensatz zu den vorherigen Linien einen nahezu linearen Enzymanstieg mit der Zeit bei einer niedrigeren IFN-Konzentration von 100 U/ml.
(vgl. Abb. 17)



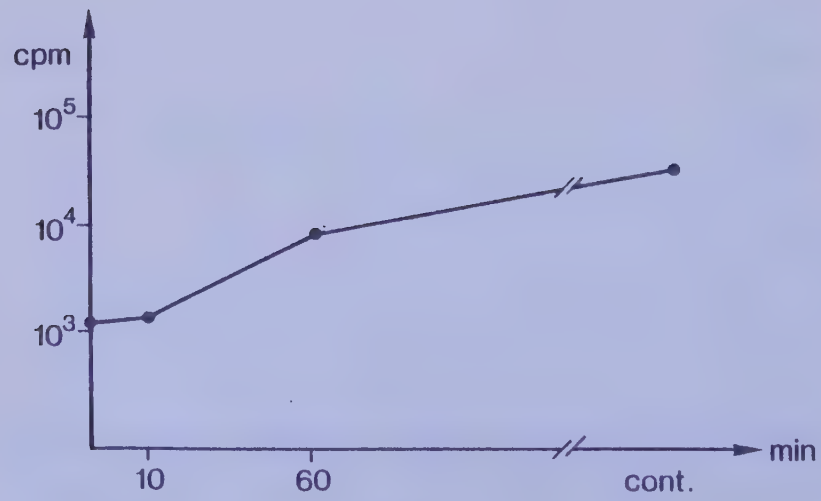
CCL 127 5000 U/ml β-JFN Abb.14



CCL 136 RD 1000U/ml β-JFN Abb.15



SK-N-FJ 500U/ml β-JFN Abb.16



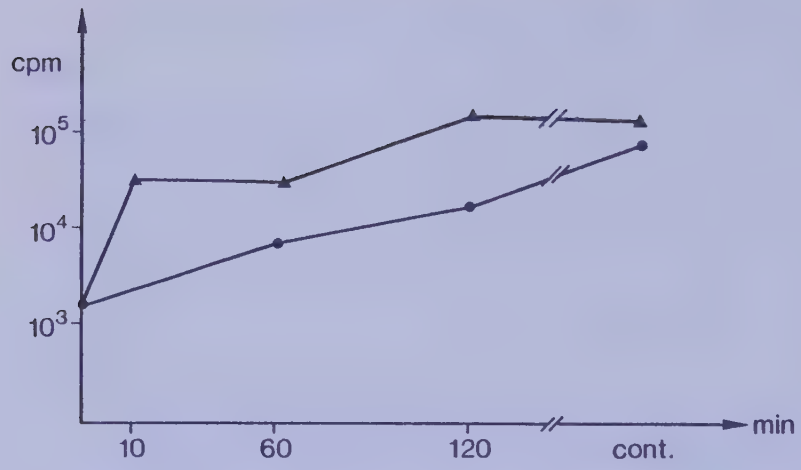
SAOS 2 100U/ml β-JFN Abb.17

4.2.3.2. Der Enzymanstieg in Abhängigkeit von der IFN-Konzentration

Für zwei verschiedene Tumorzellinien wurde der Enzymanstieg unter verschiedenen IFN-Konzentrationen untersucht.

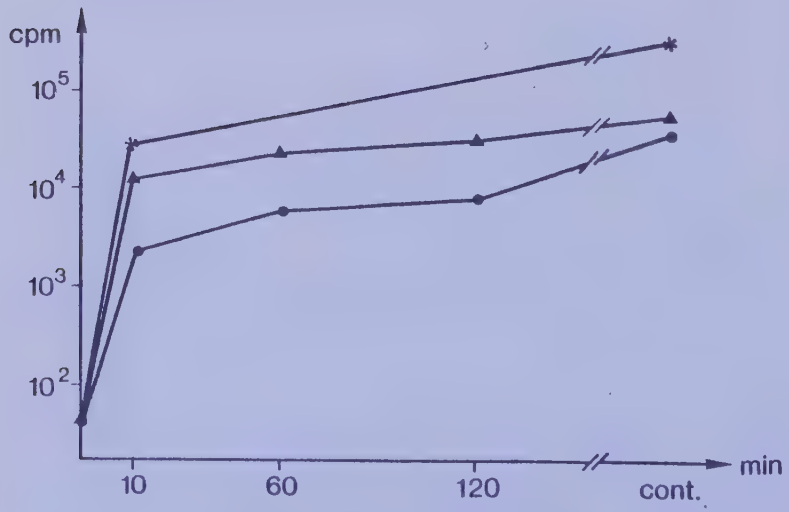
1. Die (wiederum bezüglich der Wachstumshemmung) relativ IFN-unempfindliche Tumorzellinie SAOS-2 wurde mit 100 und mit 1000 U/ml ß-IFN jeweils gleich lang behandelt.
   Der 10 Minuten-Wert lag bei höherer IFN-Konzentration deutlich höher, wobei sich aber unter Dauerexposition, d.h. einer ununterbrochenen IFN-Exposition über 24 Stunden, die Enzymwerte trotz verschiedener IFN-Konzentration nur noch wenig voneinander unterschieden.
   (vgl. Abb. 18)
2. Ähnliches gilt auch für die konzentrationsabhängigen Unterschiede für die relativ IFN-unempfindliche Zellinie CCL 127.
   Die zu vergleichenden IFN-Konzentrationen waren einmal 100 U/ml und dann 1000 U/ml ß-IFN.
   Auch hier sind die Werte nach 10 Minuten in Abhängigkeit von der IFN-Konzentration deutlich unterschieden. Die Endaktivitäten unter Dauerexposition (d.h. 24 Stunden) waren jedoch (im Gegensatz zu SAOS-2) bei den verschiedenen Konzentrationsstufen um so höher, je höher die IFN-Konzentration war.
   (vgl. Abb. 19)

Um einen Vergleich der Ergebnisse untereinander und mit anderen Ergebnissen zu ermöglichen, sind in Tab. 3 die Enzymwerte in Relation zu den Ausgangswerten wiedergegeben.
Zur Interpretation dieser Ergebnisse s. 5.3.4.



SAOS 2 ●—● 100 U/ml β-JFN ▲—▲ 1000 U/ml β-JFN

Abb. 18



CCL 127 ●—● 100 U/ml ▲—▲ 1000 U/ml

— 5000 U/ml β-JFN Abb. 19

Tab. 3 Relative Enzymanstiege in den Tumorzellextrakten in der Reihenfolge der Abb. 14 - 19 (mit Standardabweichung der Doppelwerte)

Tumorzellinie	IFN-Konzentration	K	10min	60min	120min	Dauer (24 Stunden)
CCL 127	5000 U/ml	1	172 ±26,1	208	-	219 ±50,2
CCL 136 (RD)	1000 U/ml	1	390 ±74,2	454 ±51,6	-	723
SK-N-FJ	500 U/ml	1	203 ±78,5	183 ±17,7	-	279 ±48,6
SAOS 2	100 U/ml	1	2 ± 0,7	8 ± 0,7	-	45 ±11,3
SAOS 2	100 U/ml	1	-	3	10	31 ± 9,2
SAOS 2	1000 U/ml	1	21	17 ± 6,4	70 ±12,7	61
CCL 127	100 U/ml	1	8	13 ± 0,7	15 ± 7,1	52
CCL 127	1000 U/ml	1	30	61 ±28,3	91 ±21,2	94 ±36,1
CCL 127	5000 U/ml	1	76	-	-	249

5. Diskussion

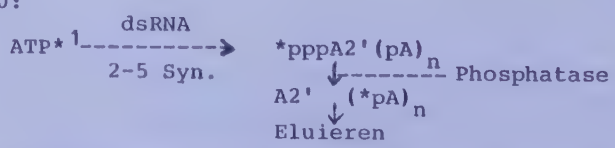
5.1. Die Methodik

Die ersten Versuche für den Nachweis der 2-5 Synthetase basierten auf der Fähigkeit der Reaktionsprodukte, die zellfreie Proteinsynthese zu hemmen (13, 22, 27). Diese Versuche waren zwar sensibel aber arbeitsaufwendig, zeitraubend und kostspielig und ungeeignet für tägliche Routinebestimmungen.
Mit der Beobachtung, daß Poly (rI):(rC), eine synthetische dsRNA, das Enzym bindet und zugleich aktiviert, wurden Herstellung der Reaktionsprodukte und somit Nachweis der Enzymaktivität vereinfacht (44).

Die hier dargestellte - in Anlehnung an die von REVEL et al. entwickelte (85) - Versuchsanordnung ermöglichte einen indirekten Nachweis der Enzymaktivität über die Bildung seiner Reaktionsprodukte, der 2-5 A, in vitro.
Die einzelnen Versuchsschritte sind hier nochmals kurz zusammengefaßt (ausführliche Methodik unter 3.4.):

Die Zellextrakte wurden mit an Agarosekügelchen gebundenem Poly (rI):(rC) gemischt, das Enzym wurde gebunden und das ungebundene Protein ausgewaschen.
Unter Inkubation mit ^{32}P-α-ATP bildeten sich 2-5 A, die mit Phosphatase behandelt wurden und als dephosphorylierte 'cores' kleine Aluminasäulen passierten. Freies Phosphat wurde festgehalten, während die 2-5 A 'cores' eluiert wurden.
(vgl. Abb. 20)

Abb. 20:



[1] Das Sternchen * bedeutet radioaktiv markierte Substanz

Die Menge an 2-5 A cores wurde anhand der Menge des inkorporierten radioaktiven Phosphors gemessen.

Zahlreiche quantitative Enzymnachweise beruhen auf der Adsorption des Enzyms aus den Zellextrakten an Poly (rI):(rC), die z. T. an Agarose (7, 9, 12, 44, 45, 57, 80), an Papier (16, 26) oder an Sepharose (27, 61, 118) gebunden wurde.
Es konnte z.B. nachgewiesen werden, daß 95 % der enzymatischen Aktivität an Poly (rI):(rC) Agarose gebunden wurde (10).

Die hier verwendete Agarosetechnik war bequem, da rohe Zellextrakte verwendet werden konnten. Das an die mit Poly (rI):(rC) beladene Agarose gebundene Enzym wurde mehrfach gewaschen, und obwohl es dadurch keinem spezifischen Reinigungsprozeß unterworfen wurde, band bei dieser Methode kein kontaminierendes Protein (45) und auch keine die 2-5 A bzw. die dsRNA abbauenden Enzyme (d.h. die Phosphodiesterase (s. 1.3.2.3.) bzw. dsRNA-Nukleasen (46)) an die Agarose. Doch sind es u.a. diese Proteine, die quantitative Enzymvergleiche zwischen Ergebnissen aus unterschiedlichen Untersuchungsanordnungen in Frage stellen.
Das ungebundene Material konnte abzentrifugiert werden.

Unbequem wäre diese Technik, wenn es darum ginge, enzymkinetische Daten zu erhalten z.B. über die optimale Konzentration der aktivierenden dsRNA (hier also der Poly (rI):(rC)) oder über die Auswirkungen unterschiedlicher Nukleotidsequenzen der aktivierenden dsRNA.

Die anschließende Inkubation mit ^{32}P-α-ATP, eine Methode, die in dieser Arbeit von anderen Untersuchern (44,54,57) Übernommen wurde, resultierte in der Bildung der 2-5 A.

Als ebenso brauchbar erwies sich ^{3}H-ATP (7,11,104,118).

Außer der unbedingten Anwesenheit von dsRNA und ATP

erwiesen sich Mg^{2+} und K^{+} als die Synthese der 2-5 A begünstigenden Faktoren (44, 89).
Für die Trennung der 2-5 A vom ATP wurde zunächst eine chromatographische Trennungsmethode mittels DEAE-Cellulose entwickelt (44).
Hier wurden durch eine Behandlung mit bakterieller alkalischer Phosphatase die 5'ständigen Phosphatgruppen abgespalten:
Die 2-5 A wurden dephosphoryliert und dadurch biologisch inaktiv (45).
Dagegen entstanden unter Inkubation mit ^{32}P-γ-ATP nach Phosphatasebehandlung keine radioaktiven 'cores' (139), da sämtliches radioaktives Phosphat als anorganisches Phosphat frei wurde (57).
Die Trennung der dephosphorylierten 2-5 A 'cores' vom freien Phosphat erfolgte auf Aluminasäulen:
Das Alumina bindet freies Phosphat (70), während die 2-5 A cores eluiert wurden.
Das eluierende Medium, hier Glycin HCl, mußte einen relativ niedrigen pH Wert, hier pH 2, haben.
Nach REVEL et al. (85) konnten 95-100 % der Dimere und Trimere zurückgewonnen werden, wenn der pH Wert zwischen 2 und 5 lag.
Dies war ein Unterschied zu anderen Methoden:
der Nachweis der 2-5 Synthetase über die Aktivierung der Nuklease (65, 139) und die Reinigung der 2-5 A ohne Phosphatasebehandlung mittels Chromatographie auf DEAE Cellulose (7, 11, 57, 67, 88) ließen die Dimere unentdeckt.
Dagegen wurden hier höhere Oligomere (vom Hexamer aufwärts), die unter hohen Enzymkonzentrationen und langen Inkubationszeiten entstehen, in geringerem Ausmaß eluiert, wie REVEL et al. mit dieser Versuchsanordnung nachweisen konnten (85).
Die Bedingungen, die in diesen Versuchen geherrscht haben, v.a. der obengenannte niedrige pH Wert des

Eluats, waren identisch mit den von REVEL et al. entwickelten (85). Diese fanden keine anderen Nukleotide im Eluat. Die Strukturen der gebildeten 2-5 A cores wurden wegen der identischen Versuchsbedingungen nicht verifiziert.
Über die Menge an inkorporiertem ATP liegen unterschiedliche Angaben vor: Manche wiesen einen 20%igen (111), andere einen bis zu 60%igen (89) Umbau des ATP in 2-5 A nach. Sogar über einen bis 90%igen Einbau des radioaktiven Phosphats ist berichtet worden (105).
Hier wurden 10-50 % des ATP im Eluat als 2-5 A cores wiedergefunden. Wurde nur die halbe Zellextraktmenge genommen, ergaben sich halbe Enzymaktivitäten, d.h. die Zellextraktmenge ist der gemessenen Enzymaktivität proportional.

Die Zellextrakte konnten bei -70°C gelagert werden, ohne an Aktivität zu verlieren.
(-20°C waren nicht ausreichend).
Hauptprobleme der hier beschriebenen Methodik waren neben den Pipettier- und Meßfehlern die von Versuchsreihe zu Versuchsreihe stark schwankenden Backgrounds (s. auch 85, 108), d.h. der Werte, die ohne Zellextrakte und damit ohne Enzym alle Schritte des Versuchs durchliefen (s. 3.4).
Sie waren z.T. erhöht, so daß die gewonnenen Ergebnisse nicht ausgewertet werden konnten.
Dagegen waren die Abweichungen der Doppelwerte gering. (s. 3.4).
Gründe für die "Verunreinigung" des Backgrounds können in verunreinigten Materialien wie auch in das Ergebnis fälschenden Enzymaktivitäten liegen. So konnte z.B. während einer Versuchsreihe eine ungenügende Wirkung der bakteriellen alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden. Der hohe Background konnte durch eine wiederholte Behandlung mit neuer alkalischer Phosphatase vermieden werden.

Es zeigten sich auch Unterschiede der Ergebnisse in Abhängigkeit vom verwendeten radioaktiven ATP, woraus man auf eventuelle Verunreinigungen der radioaktiven Substanz schließen könnte (s. auch 57, 85).
Da das Enzym insbesondere von ATP, dsRNA, Mg^{2+} und K^{+} abhängig ist, können auch hier Fehlerquellen entstehen. Besonders die Elektrolyte können die Höhe der Enzymaktivität beeinflussen (89).
Außerdem ist die Enzymaktivität u.a. noch vom pH Wert und der Temperatur abhängig (105).
Auch die Konzentration der dsRNA ist wichtig für die Enzymaktivität: ist ein optimaler Wert überschritten, kommt es zum Abfall der Enzymaktivität (105).

Alle in der Literatur angegebenen Methoden beinhalten radiochemische Nachweise der Enzymaktivität, rein chromatographische oder spektrophotometrische Verfahren (ohne Verwendung von Tritium oder radioaktivem Phosphor) wurden nicht angewendet. Möglicherweise lassen sich die Nukleotide dann nicht eindeutig abgrenzen von anderen Reaktionsprodukten.

5.2. Der Nachweis der 2-5 Synthetase

5.2.1. Der 2-5 Synthetasenachweis in verschiedenen Zellen

Die 2-5 Synthetase ist in den verschiedensten Zell- und Gewebeextrakten indirekt über die Bildung der 2-5 A bestimmt worden (vgl. Tab. 4).

Tab. 4 Bestimmung der 2-5 Synthetase

1. In Zellextrakten von IFN behandelten
   L 929 Mäusezellen (20, 46, 57, 72, 104)
   primären Hühnerembryozellen (13)
   Kaninchenreticulocyten (21, 45)
   HeLa Zellen (8, 88, 138)
   Ehrlichascitestumorzellen von Mäusen (99)
   embryonalen Mäuseteratocarcinomzellen (135)
   BSC-1 Affennierenzellen (61)
2. In Extrakten unbehandelter
   Kaninchenreticulocyten (45)
   Mäuselymphocyten der Milz (115)
3. In Gewebeextrakten aus
   Milz und Lunge der Maus (67)
   Leber der Maus (48)
4. Im Serum von Mäusen, die IFN-behandelt waren (67)
   (möglicherweise durch Freisetzung aus IFN-behandelten Zellen?)
5. In Virionen (129)
   (die auch das Enzym in nichtinfizierte Zellen transportieren können).

Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungsergebnissen sind besonders die Untersuchungen der Enzymaktivität bei Lymphocyten interessant.
SHIMIZU und SOKAWA (115) fanden hohe Enzymspiegel in Extrakten von Mäuselymphocyten. Dabei ergaben sich Unterschiede bei Lymphocyten unterschiedlicher Herkunft: die aus der Milz und aus mesenterialen Lymphknoten hatten hohe, die aus Knochenmark und Thymusgewebe weniger hohe, dagegen die aus der Leber nur sehr geringe und die aus dem Gehirn überhaupt keine nachweisbaren Enzymspiegel.

SHIMIZU und SOKAWA vermuteten, daß Lymphocyten einem dauernden IFN-Einfluß ausgesetzt sind, und daß das 2-5 A System in irgendeiner Weise für den niedrigen Pegel der Proteinsynthese in (unstimulierten) Lymphocyten und/oder die Resistenz der Lymphocyten gegenüber Virusinfektionen verantwortlich ist.
Auf die (noch hypothetischen) Zusammenhänge zwischen der 2-5 Synthetase und den wachstumshemmenden Einflüssen von IFN wird weiter unten eingegangen (s. 5.4.).
Ebenso fanden sich in menschlichen Lymphocytenextrakten hohe basale Enzymspiegel (60, 108, 109).
SCHATTNER et al. (108, 109) wiesen nach, daß weiße mononukleäre Zellen, v.a. Lymphocyten, Monocyten und Macrophagen höhere Enzymspiegel hatten als Granulocyten, und konnten in Erythrocyten, Thrombocyten und im Serum keine Enzymaktivitäten nachweisen.
SCHATTNER et al. (108) fanden hohe und relativ konstante Enzymspiegel in den Extrakten mononukleärer Zellen gesunder Versuchspersonen (gewonnen aus peripherem Venenblut). Diese lagen sogar 100fach höher als in Extrakten menschlicher Fibroblasten oder lymphoblastoider Zellen aus Kulturen (ohne IFN-Behandlung) (85, 119).
Auch die vorliegenden Untersuchungen (vgl. 4.1.1.) ergaben hohe Basalaktivitäten des Enzyms bei gesunden Versuchspersonen (im Vergleich zu den Ergebnissen der ebenfalls durchgeführten Untersuchungen von Tumorzelllinien in Kultur) (vgl. 4.2.3.).
Die z.T. vorhandenen Schwankungen der Ergebnisse könnten auf die Versuchsmethodik oder die Auswahl der Versuchspersonen zurückzuführen sein.

5.2.2. Enzymaktivitäten während viraler und bakterieller Erkrankungen

Wie unter 1.3. erläutert wurde, kommt der 2-5 Synthetase eventuell eine Aufgabe in der Entwicklung des antiviralen Zustandes, also in der Antwort der Zellen auf den Angriff eines Virus, zu.
Zwischen der Kinetik der Enzyminduktion und der Entwicklung des antiviralen Zustandes besteht z.T. eine gute Korrelation. Ein paar wesentliche Zusammenhänge sind in Tab. 5 aufgeführt. Doch es gibt auch andere Ergebnisse, über die unter 5.4. eingegangen wird.

Tab. 5 Korrelation zwischen Enzyminduktion und antiviralem Zustand

1. Die Enzyminduktion läuft in vielen Zelltypen parallel zu Entwicklung des antiviralen Zustandes (7, 13, 44, 122).
2. Unter den höchsten Enzymaktivitäten findet sich zum größten Teil der beste Schutz gegen Virusinfektionen (69).
3. Die Enzymaktivität und der antivirale Zustand zeigen z.T. die gleiche IFN-Dosisabhängigkeit (7, 44).
4. Die strukturellen Merkmale der dsRNA (vgl. 1.1.) für Enzyminduktion und Herbeiführung des antiviralen Zustandes sind identisch (4). Auch die optimale dsRNA-Konzentration ist gleich für die Induktion der Synthetase und der Proteinsynthesehemmung (45).
5. Mit Actinomycin D kann die Enzyminduktion wie auch die Entwicklung des antiviralen Zustandes verhindert werden (7, 61, 121).
6. Das 2-5 A System bietet eine gute Erklärung für den Abbau viraler mRNA (s. 1.3.2.).

In virusinfizierten Mäusen konnte ein Anstieg der 2-5 Synthetase nachgewiesen werden: im Serum (67) und in Leber- und Milzgewebe (48).

Auch bei Patienten mit viralen Infekten ist das IFN-System stimuliert.
Bei Kindern mit viralen Infekten konnten erhöhte 2-5 Synthetasespiegel nachgewiesen werden, die mit der Schwere der Krankheit variierten (108, 109, 134).
SCHATTNER et al. (109) wiesen bei 95 % der an viralen Infektionen erkrankten untersuchten Patienten erhöhte Enzymspiegel nach. Besonders hoch war der Spiegel bei einem Patienten mit Herpes zoster (19facher Anstieg).
In dieser Untersuchung (109) hatten 2 der 41 untersuchten Patienten jedoch normale Enzymspiegel. Das beruhte eventuell auf einer nichtviralen Ätiologie der Erkrankung.
Auch in Bläschenflüssigkeit, gewonnen aus Vesikeln von Herpes zoster oder Herpes simplex, konnte die 2-5 Synthetase nachgewiesen werden (134).
MORAG et al. (91) fanden erhöhte Enzymspiegel bei Patienten mit hohen Spiegeln von IgM Antikörper gegen das Capsidantigen des Epstein-Barr-Virus. Obwohl keine Hinweise für virale oder bösartige Erkrankungen vorlagen, ließen die erhöhten Enzymspiegel eher auf eine latente virale Infektion schließen als auf einen Defekt im IFN-System.

In diagnostischer Hinsicht könnte die Bestimmung des Enzyms im Liquor selbst oder in Zellen des Liquors sinnvoll sein für den Nachweis einer durch Viren hervorgerufenen Encephalitis.
Fraglich ist, ob intrauterine Infektionen postpartum durch eine 2-5 Synthetasebestimmung im Blut von Mutter und Kind näher bestimmt werden können (134).

Die Gruppe der Kinder mit Virusinfektionen in vorliegender Studie hatte verglichen mit der Gruppe der

Kinder ohne Infekte signifikant höhere Enzymspiegel (vgl. 4.1.3.), was mit den Untersuchungsergebnissen von SCHATTNER et al. (109) in Einklang steht.
Da die Zeitabstände zwischen Krankheitsbeginn und Enzymbestimmung unterschiedlich lang waren, läßt sich keine Aussage machen über charakteristische Enzymanstiege für bestimmte Virustypen oder über Zusammenhänge zwischen Krankheitshöhepunkten und Enzymaktivitätsveränderungen.
Weitere Studien sind notwendig, um die Bedeutung der 2-5 Synthetase in den angedeuteten Zusammenhängen zu klären.

Während bakterieller Infektionen schien die 2-5 Synthetase nicht anzusteigen (109, 134). SCHATTNER et al. (109) konnten jedoch bei 2 der 13 untersuchten Patienten mit bakteriellen Infekten erhöhte Enzymspiegel nachweisen.

In vorliegender Arbeit waren unter dem Einfluß bakterieller Erreger leicht erhöhte Enzymspiegel nachweisbar (vgl. 4.1.3.).
Der Zusammenhang zwischen dem 2-5 Synthetasenachweis und dem direkten Nachweis von IFN im Serum ist nicht eindeutig. SCHATTNER et al. (109) konnten im Serum von 24 Patienten mit viralen Infekten in 11 Fällen kein IFN nachweisen, während der Nachweis der 2-5 Synthetase nur in einem Fall negativ war.
Eine Ursache dafür könnte sein, daß die 2-5 Synthetase noch nachweisbar war, während IFN schon aus dem Serum verschwunden war.
Auch scheint der IFN-Nachweis im Gegensatz zum Nachweis der 2-5 Synthetase vom infizierenden Organismus abzuhängen: Bei Influenzaviren war IFN im Serum in über 50 % der Fälle nachweisbar, bei Adenoviren fast immer und bei Hepatitis- und Herpesviren immer unentdeckbar (96).
Es liegen hier leider keine Angaben für den Zeitpunkt der IFN-Bestimmung vor.

Unterschiedliche Ergebnisse liegen für bakterielle Erreger vor: IFN war im Serum nicht nachweisbar (82), im Falle von Staphylokokken aber in 60 % der Fälle positiv (96).
Korrelationen zwischen den Ergebnissen der hier durchgeführten Versuche mit den jeweils vorhandenen IFN-Spiegeln wurden hier nicht untersucht.
Bisher scheinen sich keine klaren Zusammenhänge zwischen der 2-5 Synthetase und dem IFN-Spiegel im Blut zu ergeben.

5.2.3. Enzymveränderungen während maligner Tumorerkrankungen

SCHATTNER et al. (108) konnten bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) ohne Infekte erniedrigte Enzymwerte feststellen.
Ebenso fanden KIMCHI et al. (60) in 4 von 9 Patienten mit ALL extrem niedrige Spiegel, die z.T. nur 10-20 % des Normwertes waren und auch im Vergleich mit anderen Untersuchungen einzigartig niedrig waren.
(Leider fehlen Angaben darüber, ob die Kinder vor dem Therapiebeginn standen.)

Die hier vorgelegten Ergebnisse, die aufgrund gleicher Versuchsanordnung mit den obengenannten gut verglichen werden können, ergaben für die Patienten mit ALL auch erniedrigte Werte: bei 3 von 6 Patienten ergaben sich Enzymspiegel, die nur 20 - 30 % des Durchschnittswertes der Vergleichsgruppen waren.
Ob diese niedrigen Werte auf Änderungen im 2-5 A System, auf Dysfunktionen im Immunsystem oder auf irgendeinen anderen Einfluß zurückzuführen ist, blieb unklar.
Es ist möglich, daß differenzierte, nicht proliferierende Zellen höhere Synthetasespiegel haben als unreife, schnell wachsende Zellen (60). Die 2-5 Synthetase

könnte also eine Rolle in der Zelldifferenzierung spielen.

Die niedrigen Enzymspiegel könnten also auch darauf hinweisen, daß in den untersuchten Zellfraktionen unreife Zellen vorhanden sind, wobei aber anzumerken ist, daß die Spiegelwerte in keiner Weise mit dem Blastenanteil korrelierten.
Auch die Enzymwerte der behandelten Kinder lagen zum größten Teil niedriger als die in den Vergleichsgruppen. Dies ist wahrscheinlich die Folge medikamentöser Therapie.

Bei Kindern mit malignen Tumorerkrankungen waren die Enzymschwankungen so groß, daß man mit einer Bewertung der Ergebnisse zurückhaltend sein muß. Die Tendenz ging dahin, daß diese Kinder, besonders unter Therapie höhere Enzymwerte hatten als die Vergleichsgruppen.

5.2.4. Der Enzymanstieg unter IFN-Therapie

Der Enzymanstieg bei den mit IFN behandelten Patienten war signifikant, aber unterschiedlichen Ausmaßes (vgl. 4.1.4.).
Bei einem Patienten mit Larynxpapillom lag ohne IFN-Gabe bereits ein hoher Enzymspiegel vor, der auf eine mögliche Virusaktivität zur Zeit der Enzymbestimmung schließen läßt. (Seit der letzten IFN-Gabe waren 4 Monate vergangen).
Trotz des hohen Ausgangswertes stieg die Enzymaktivität unter IFN an.
Auch SCHATTNER et al. (108) fanden unter der Gabe von α-IFN einen Enzymanstieg.

Bei einer Patientin mit Melanom war der Enzymspiegel nach 30 Stunden deutlich erhöht.
Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß die Enzymaktivität zum Zeitpunkt der Bestimmung bereits das Aktivi-

tätsmaximum überschritten hatte.

Bei Patienten, für die vor IFN-Behandlung keine Ausgangswerte vorlagen, war es schwierig zu sagen, ob der Enzymanstieg auf die IFN-Therapie oder auf die Grunderkrankung zurückzuführen war (vgl. 4.1.4.).

5.3. Die Interferonstimulation von Zellen - in vitro

5.3.1. Übersicht über IFN-Stimulationsversuche mit verschiedenen Zellen

Über zeit- und konzentrationsabhängige Enzymanstiege ist in zahlreichen Untersuchungen berichtet worden.
In Tab. 6 sind einige Untersuchungsergebnisse zusammengefaßt.
Dabei wurden aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen, Zellzuchtmethoden usw. nicht die absoluten Enzymspiegel verglichen, sondern die Enzymaktivitäten relativ zu den jeweiligen Kontrollwerten ausgedrückt.

Es ist unschwer erkennbar, daß die Variationsbreite der Enzymaktivitäten in den Zellen unterschiedlicher Herkunft sehr groß ist.
Man beachte z.B. den außerordentlich hohen Enzymanstieg auf das bis 10.000fache des Ausgangswertes in Extrakten primärer Hühnerembryozellen (10).
Zellulär bedingte Unterschiede in den Enzymaktivitäten werden besonders dann deutlich, wenn man die Untersuchungen verschiedener Zelltypen ein und desselben Autors vergleicht, z.B. die Untersuchungen von HOVANESSIAN et al. (47) von L 929, NIH/3T3 und K/Balb Zellen.

Trotz Verwendung gleicher Zellen und gleicher IFN-Konzentrationen ergaben sich bei verschiedenen Untersuchern verschiedene Enzymspiegel.

Interessant ist auch die Stimulation von L 929 Zellen mit 100 U/ml für 20 Stunden. Zwei verschiedene Untersucher fanden (allerdings mit verschiedenen Techniken) einmal einen 9fachen Anstieg des Enzymspiegels ohne Virusinfektion (118), im Gegensatz zu einem 200fachen Anstieg mit Virusinfektion (94).
Die Ergebnisse verschiedener Labors lassen sich nicht direkt vergleichen, zu viele unbekannte, methodenabhängige Faktoren können die Enzymaktivität beeinflussen. So sind auch die mit der hier aufgestellten Methodik gefundenen Ergebnisse nur bedingt mit denen der Literatur vergleichbar.

Tab. 6 (I) IFN-Stimulationsversuche mit verschiedenen Zellen und die Auswirkungen auf die Enzymaktivität

Zelltyp (Herkunft: Maus)	IFN-Typ[1]	IFN-Konzentration (U/ml)	Inkubationszeit (h)	Anstieg[2]	Literatur
L 929 Zellen	β	10	20	3	)
	β	100	20	9	) 118
	β	1000	20	13	)
	β	50	8	11	116
	β	50	8	10	101
	β	100 (mit Virusinfektion)	20	200	94
	β	200	24	15	61
	β	200	24	10	139
	β	250	17	50	47
	β	250	1-48	60-250	48
	β	300	20	100	27
	β	400	17	200	59
	α	500	20	20	) 16
	β	500	20	20	)
NIH/3T3 Zellen	β	250	17	130	47
3T6B2 Zellen	β	200	18	100	52
K/Balb Zellen	β	200	17	-	47
embr.Carcinomzellen	β	100	20	60	94
	β	250	17	150	135
Lymphocyten	β	2000	24	2	115
Lebergewebe	β	20×10^4 U/Maus	24	2	) 48
Milzgewebe	β	"	24	4	)

Tab. 6 (II)

Zelltyp (Herkunft: Mensch)	IFN-Typ[1]	IFN-Konzentration (U/ml)	Inkubationszeit (h)	Anstieg[2]	Literatur
HeLa Zellen	γ	20	24	6	6
	β	50	20	14	89
	α	100	24	15	5
	β	100	24	25	6
	β	100	17	10	8
	β	500	24	15	5
	α (Maus)	500	24	6	138
	β (Maus)	500	24	-	138
	"	5000	24	-	138
FS 11 Zellen	β	15	14	6	116
	β	15	20	8	101
RSa Zellen	β	200	24	20	127
HEC 1 Zellen	β	25000	24	-	127
MRC 5 Zellen	α oder β	300	18	-	86
Amnion U Zellen	β	15	20	100	27
Fibroblasten	β	100	24	?	69
	β	1000	24	20	127
FS 4 Zellen	β	250	18	200	112
(Herkunft: Huhn) embr.Zellen	β	1	20	10	) 10
	β	100	20	2000-10000	)

[1] wenn nicht anders vermerkt, handelt es sich um homologes IFN

[2] der Anstieg wird relativ zu den Kontrollwerten angegeben

5.3.2. Die IFN-Stimulation von menschlichen Lymphocyten

Trotz des hohen Basalspiegels in Lymphocyten war unter IFN-Stimulation ein weiterer Anstieg der Enzymaktivität nachzuweisen.
SCHATTNER et al. (108) konnten mit einer in-vitro-Stimulation mit 100 U/ml α-IFN einen 6fachen Anstieg des Enzyms erreichen.
Der in der vorgelegten Arbeit gemessene Anstieg der Enzymaktivität auf das 3,5 - 4fache des Ausgangswertes mit 100 U/ml β-IFN lag damit in vergleichbarer Größenordnung (vgl. 4.2.1.).
Die klinische Bedeutung dieser IFN-Stimulation von Lymphocyten in vitro liegt darin, sie als präthera-peutischen Test vor dem Beginn einer IFN-Therapie durchzuführen, um Auskunft zu erhalten über die Reaktionsweise der einzelnen Patienten auf IFN.

5.3.3. Der 2-5 Synthetaseanstieg unter verschiedenen IFN-Typen bei Zellinien

Ein einzelner Wirbeltierorganismus kann - abhängig von Zelltyp und Stimulus - verschiedene IFN-Typen synthetisieren (120).
Über den Einfluß verschiedener IFN-Typen auf die 2-5 Synthetase liegen bisher nur wenige Vergleiche vor.
Für α- und β-IFN konnten identische biochemische Aktivitäten nachgewiesen werden:
α-IFN hatte eine gleich hohe enzyminduzierende Aktivität (16,86) wie β-IFN bzw. eine leicht höhere Aktivität (5).
In der hier durchgeführten Tumorzellstimulation war β-IFN stärker wirksam als α-IFN. Das kann an den Versuchsbedingungen, an den verwendeten Zelltypen und/oder an den verwendeten IFN-Aktivitäten liegen. Möglicher-

weise liegt diese stärkere Wirksamkeit von β-IFN in einem andersartigen Wirkungsmechanismus in diesen Zellen begründet.
γ-IFN erwies sich als weniger wirksam als β-IFN und α-IFN, was auch in anderen Untersuchungen gefunden wurde (6,25).
γ-IFN unterscheidet sich von α- und β-IFN in Molekulargewicht, Stabilität bei niedrigem pH Wert und Antigenität wie auch in antiviralen und antizellulären Eigenschaften (1,25).
So könnte auch die geringere Wirksamkeit ihre Ursache in andersartigen biochemischen Wirkungsmechanismen haben.
DIANZANI et al. (25) berichteten über einen verzögerten Enzymanstieg unter γ-IFN (im Vergleich zu α- und β-IFN) und schlossen auf eine indirekte Wirkung des γ-IFNs.
Um dafür eine Bestätigung zu erbringen sind weitere Untersuchungen der zeitlichen Abhängigkeit des Enzymanstiegs unter diesem IFN-Typ notwendig.
Wie in anderen Untersuchungen (z.B. 6, 13, 93) ergab sich auch hier kein bzw. ein leichter Anstieg unter Mock-IFN.

5.3.4. Die Interferonstimulation von Tumorzellen

Über die Zeitdauer von der IFN-Gabe bis zum Enzymanstieg liegen recht einheitliche Aussagen in der Literatur vor. Bis zu einem nachweisbaren Enzymanstieg vergehen ungefähr zwei Stunden. Das Maximum wird erst nach 8 (7) resp. 10 (10) resp. 15 (16, 46) resp. 24 (101) Stunden erreicht.
Enzymanstieg und Aktivitätsmaximum waren in diesen Untersuchungen anderen Versuchsbedingungen ausgesetzt:
Die Zellen wurden für bestimmte Zeit (10, 60 bzw. 120 Minuten) mit IFN behandelt, das IFN wurde entfernt, die Zellen aber erst 24 Stunden nach der Durchführung

der Zeitversuche lysiert.
(vgl. 3.2.2.)
Auffallend ist der rasche Enzymanstieg in den ersten 10 Minuten und die dann relativ gleichbleibende Höhe der Enzymaktivität.
Bei höherer IFN-Konzentration ergab sich ein rascherer Anstieg des Enzyms in den ersten 10 Minuten. So lagen z.B. die 10 Minutenwerte für SAOS 2 für 100 U/ml beim 2fachen und für 1000 U/ml beim 21fachen des Ausgangswertes. (vgl. Tab. 3) Die Enzymaktivitäten nach 120 Minuten und nach Dauerexposition (d.h.24 Stunden) unterschieden sich nur mehr unwesentlich.
In einer anderen Untersuchung fand sich bei 17stündiger Inkubation die gleiche Aktivität wie bei 8stündiger Inkubation (7).

Interferon scheint schnell an die Zellen zu binden (15), aber nicht (oder nur sehr langsam) in die Zellen zu penetrieren (100).
Möglicherweise war die Bindung des IFN an die Zellen unter den hier dargestellten Versuchsbedingungen irreversibel oder zumindest so stark, daß der Waschprozeß nach der vorgeschriebenen Zeit (d.h. nach 10, 60 und 120 Minuten) einen Enzymanstieg nicht verhindern konnte.
Andererseits ist denkbar, daß IFN sofort längerdauernde Effekte induziert.
Der unterschiedliche Anstieg in den verschiedenen Zelltypen deutet auf eventuelle Unterschiede der IFN-Affinität der Receptoren auf der Zelloberfläche oder auf unterschiedliche Änderungen der zellulären Kontrollmechanismen des 2-5 A Systems hin.

5.4. Der Nachweis der 2-5 Synthetase: Ein Diagnostikum für bestimmte Erkrankungen?

Um zu klären, welche Rolle IFN, z.B. bei viralen Infektionen, spielt, wurde zunächst IFN direkt im Serum bestimmt (73, 82, 96).

Diese Nachweismethode hatte einige Nachteile:

1. IFN bewirkt zahlreiche unterschiedliche Zellveränderungen, so daß das zirkulierende IFN allein nicht viel über die viralbedingte Aktivierung des IFN-Systems aussagt, d.h. der IFN-Nachweis kann als nicht spezifisch für eine bestimmte Krankheit gewertet werden.
2. IFN unterliegt im Organismus einem raschen Abbau.
3. Der IFN-Nachweis im Serum ist langwierig und relativ unempfindlich, wenn es sich um niedrige IFN-Spiegel handelt.

Die 2-5 Synthetase gilt als sensibler Indikator dafür, ob Zellen IFN ausgesetzt sind.
Die beschriebene Nachweismethode der 2-5 Synthetase könnte daher eine gute Alternative für die direkte Bestimmung von IFN im Serum sein. Es handelt sich um eine relativ wenig aufwendige, einfache, schnelle, für eine Vielzahl von Proben geeignete, reproduzierbare Methode. Wie gezeigt wurde, kann der erhöhte Enzymspiegel Folge viraler Erkrankungen und Folge von IFN-Therapie sein.

Das würde bedeuten, daß der Test nützlich sein könnte für den Nachweis von Viruserkrankungen, besonders für den Fall, wenn spezifische antivirale Therapie möglich sein wird oder für die Abklärung unklarer Krankheitsbilder, bei denen Verdacht auf Virusbeteiligung vorliegt.
Ebenso sinnvoll könnte in der Klinik dieses Testsystem für die Überwachung von IFN-Behandlungen sein, da durch

Enzymbestimmungen die Wirkungen von IFN überprüft werden könnten.
Z.B. könnte die IFN-Behandlung einer Herpes-zoster-Infektion, die als Folge reduzierter Immunabwehr unter cytostatischer Therapie (vgl. 4.1.4.) auftreten kann, in ihrem Heilungsprozeß anhand der Enzymbestimmung beurteilt werden.
Wenn die molekularen Grundlagen der IFN-bedingten Tumorwachstumshemmung, v.a. die Rolle der 2-5 Synthetase, geklärt sind, könnte IFN gezielter in der Therapie von Tumorerkrankungen eingesetzt werden. Dabei könnte die Entscheidung, welche IFN-Typen günstiger für den Verlauf diverser Krankheiten sind, wie auch die eventuelle Entscheidung für den Einsatz von IFN-Induktoren durch die 2-5 Synthetasebestimmung erleichtert werden.
Niedrige Enzymspiegel, z.B. bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (vgl. 4.1.3.) könnten auf verminderte IFN-Produktion hinweisen.
In diesem Falle könnten IFN-Gaben das defekte Immunsystem stimulieren und hohe Enzymspiegel dann Zeichen einer guten Reaktion des Erkrankten auf das IFN sein.

So könnte der Test auch prognostische Aussagekraft für den Verlauf von Erkrankungen und für die Erfolge von IFN-Behandlungen haben.
Wichtig könnte die in 5.3.2. skizzierte Bedeutung der IFN-Stimulation und der anschließenden Enzymbestimmung als prätherapeutische Testung vor IFN-Therapien sein.

Wichtig könnte der Test aber auch sein, um Erkenntnisse über Wachstum und Hemmung der verschiedenen Gewebe durch IFN zu gewinnen.
Dazu sind noch folgende Bemerkungen zu machen:
Daß IFN die Zellproliferation hemmen kann, ist bekannt. (120).
Kann es aber sein, daß dieser wachstumshemmende Effekt von IFN auch durch 2-5 Synthetaseaktivität vermittelt

wird?
In Kulturmedien intakter Lymphocyten konnten 2-5 A einen antimitotischen Effekt hervorrufen (62). Wurden die Zellen mit Concavalin A behandelt, sank die Menge an 2-5 A ab, d.h. diese stimulierten Lymphocyten enthalten eine Aktivität, die die Synthese von 2-5 A hemmt (oder ihren Abbau vermehrt); gibt man dann IFN zu den stimulierten Lymphocyten, steigt die 2-5 Synthetaseaktivität an und scheint den Aktivitätspegel des Hemmstoffes zu übersteigen (62).
Das hieße, daß schnell proliferierende Gewebe (also mit aktiver DNA-Synthese) einen niedrigen Spiegel an 2-5 A hätten; die 2-5 Synthetaseaktivität könnte also gehemmt sein.
Möglicherweise spielen die nichtphosphorylierten Kerne der 2-5 A (abgekürzt mit 2-5 ApApA) eine eigene Rolle in der Wachstumshemmung (65, 130, 39). Interessanterweise scheint auch ihr Spiegel in mit IFN behandelten und virusinfizierten Zellen höher zu sein als in nur mit IFN behandelten Zellen (65). Es konnte festgestellt werden, daß chemisch synthetisierte 2-5 ApApA antimitotische IFNWirkungen imitieren können (64).
Es gibt Zellen, die gegenüber IFN bezüglich der antiviralen und der Wachstumshemmung resistent sind, wahrscheinlich deshalb, weil sie keine RNase haben - könnte hier also die RNase an der antimitotischen Wirkung beteiligt sein (63)?
Da man unter einem mitogenen Stimulus eine Erhöhung der Phosphodiesterase feststellen konnte, könnte auch dieses Enzym (das in 1.2.2.3. beschrieben wird) eine wachstumsfördernde Aufgabe haben (64, 101).
Vielleicht ist das Verhältnis zwischen der 2-5 Synthetase (bzw. den 2-5 Oligonukleotiden) und der Phosphodiesterase wichtig für die Regulation der Zellteilung.

VANDENBUSSCHE et al. (126) untersuchten die Mutante einer Zellinie (menschliche Fibroblasten), die gegen die wachstumshemmende Wirkung von IFN resistent war - im Gegensatz zur unveränderten Stammzellinie. Die Empfindlichkeit gegenüber der antiviralen Wirkung durch IFN war bei beiden Zelltypen gleich gut.
Es konnte gezeigt werden, daß sich die Mutante unter IFN biochemisch offenbar gleich verhielt: Sowohl die 2-5 Synthetase wie auch die Phosphodiesterase wie auch die RNase stiegen an, es lag keine veränderte Abbaugeschwindigkeit vor, und die entstandenen 2-5 Oligomere hatten eine unauffällige Verteilung.
Für diese Zellinie genügt die Enzyminduktion für die Herstellung einer Wachstumshemmung sicher nicht.
Es zeigte sich, daß die Zellmutante über weniger IFN-Bindungsstellen verfügte: vielleicht ist für die wachstumshemmende Wirkung eine höhere IFN-Konzentration nötig.
Ob die antimitotische und die antivirale Wirkung von IFN eine gemeinsame Basis besitzen, und ob die 2-5 Synthetase ursächlich beteiligt ist, muß noch offen bleiben.
Aufgrund verschiedener Überlegungen muß kritisch überdacht werden, die 2-5 Synthetasebestimmung für weitere Untersuchungen einzusetzen:

1. Der nachweisbare Basalspiegel des Enzyms in vielen Zellen deutet darauf hin, daß die 2-5 Synthetase ein normaler Bestandteil der Zellen und somit des RNA-Stoffwechsels ist.
   Die Aufgaben der 2-5 Synthetase lassen sich nicht auf die Induktion des antiviralen Zustandes reduzieren.
   Nicht in allen Fällen kann eine nachweisbare Enzymaktivität mit der Bildung eines antiviralen Zustandes gleichgesetzt werden.
   (vgl. Tab. 7)

	ohne IFN Stim.		mit IFN Stim.		Virusresistenz		IFN-Produktion		Lit.
	2-5 Syn.	Pk	2-5 Syn.	Pk	- IFN	+ IFN	- Stim.	+ Stim.	
K/Balbzellen (Maus)	++	-	=	+	-	+	+		47
HEC-1 Zellen (Mensch)	++		=			virus-spez.	-		127
Daudizellen (menschl.Lymphom-linie, mit EBV)	++	-	=	-		+			86
3T6-VB2 Zellen (Maus)	+	+	+	+	+				52
Embryozellen (Huhn)	+	+	+	+	-				13
NIH/3T3 Zellen (Maus)	-	-	+	-	-	+	-		47
EC Zellen (Maus)	-	-	+	-		virus-spez.		-	94, 135,18
MRC5 Zellen	-	-	-	-		+			86
Leber/Nieren-gewebe (Maus)	-	-	-	-					67

Es bedeuten für die Enzymnachweise mit oder ohne IFN-Stimulation:

++	Enzym sehr hoch
+	Enzym hoch
-	kein Enzym nachweisbar
=	Enzymspiegel gleichbleibend

Es bedeuten für die Virusresistenz und die IFN-Produktion:

+	nachweisbare Aktivität
-	keine nachweisbare Aktivität

Zu Tab. 7: Enzymaktivität und Bildung eines antiviralen Zustandes mit und ohne IFN-Stimulation

So gibt es Zellen, in denen keine 2-5 Synthetase nachgewiesen werden kann, die aber dennoch virusresistent sind (86) und Zellen, in denen der IFN-Effekt virusspezifisch ist (18, 95, 134).
Sicherlich beruht die Entwicklung des antiviralen Zustandes auf einer großen Zahl spezifischer und z.T. noch ungeklärter Mechanismen, die möglicherweise von Zelle zu Zelle variieren.
In diesem Zusammenhang wäre es interessant, das Enzym in anderen Blutzellen, z.B. den Granulocyten zu bestimmen.

2. Das Fehlen des Enzyms könnte wegen einer fehlerhaften Affinität für dsRNA, eines schnellen Abbaus oder einer hemmenden Aktivität zum Ausdruck kommen.
Auch andere Bestandteile des 2-5 A Systems können defekt sein. So hat das Fehlen der RNase die Resistenz der Zellen gegen die IFN-Wirkungen zur Folge, auch wenn die 2-5 Synthetase nachgewiesen werden kann (95).

3. Sicherlich wird die 2-5 Synthetase durch zahlreiche andere Faktoren außer IFN induziert.

STARK et al. (119) berichteten über einen Enzymanstieg in Zellextrakten aus Hühnereileitern auf das 10fache nach dem Entzug östrogener Stimulation und vermuteten eine Aufgabe des Enzyms in der Geweberückbildung.
KRISHNAN et BAGLIONI (68) fanden unter Glucocorticoiden einen Enzymanstieg in menschlichen lymphoblastoiden Zellen. Die durch Glucocorticoide vermittelte Wachstumshemmung könnte durch die 2-5 Synthetase bedingt sein.
Hohe Enzymspiegel in unbehandelten Kaninchenreticulocyten (132) und Mäuse-Friend-Zellen (119)

könnten auf einen Zusammenhang zwischen Zelldifferenzierung und 2-5 A sprechen. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen Geweberückbildung und 2-5 Synthetaseaktivität (48).

4. Über die Regulation des Zusammenspiels der 2-5 Synthetase mit anderen Enzymen, v.a. denen des 2-5 A Systems, ist wenig bekannt. So könnten die intrazellulären Spiegel des tatsächlich aktiven Enzyms unter Versuchsbedingungen verändert dargestellt werden.
   Es bleibt offen, ob die 2-5 Synthetase normalerweise 2-5 A synthetisiert.

Die 2-5 Synthetase darf nicht isoliert gesehen werden. Sie ist Teil eines Systems von ineinandergreifenden auf- und abbauenden Enzymen und Teil der zahlreichen Wirkungen von Interferon. Über die Zusammenhänge zum komplexen IFN-System und über die Auswirkungen auf die vielseitigen IFN-bedingten Änderungen der zellulären Kontrollmechanismen, besonders in Wachstum, Differenzierung und Immunsystem der Zellen ist für dieses Enzym noch wenig bekannt.
Die dargestellten Untersuchungen werfen viele Fragen auf, die noch zu lösen sind. Für den Einsatz des 2-5 Synthetasenachweises in dem angedeuteten Rahmen sind noch eingehende Untersuchungen notwendig.

6. Zusammenfassung

Mit der dargestellten Methode wurde die 2-5 Synthetase, die ein Mediator der IFN-Wirkung ist, in Zellextrakten nachgewiesen.
Der Sinn der Arbeit war es zu prüfen, ob die Methode funktioniert und darüber hinaus ihre Anwendung in einigen wenigen Bereichen aufzuzeigen - nicht um damit endgültige Aussagen zu machen, sondern um einige Anwendungsmöglichkeiten darzustellen.

I. Methode

Das Versuchsverfahren war geeignet, die Aktivität der 2-5 Synthetase indirekt über die von diesem Enzym katalysierten Reaktionsprodukte, den 2-5 A Oligonukleotiden, zu bestimmen.
Dabei entstand mit dem an synthetische dsRNA gebundenen Enzym unter Inkubation mit radioaktivem ATP $ppp(A2'P5'A)_n$, das nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase als dephosphoryliertes "core"-Oligonukleotid eluiert wurde.
In dem Eluat konnte über die Menge des eingebauten radioaktiven Phosphors die Enzymaktivität bestimmt werden.

Nicht untersucht wurde im Rahmen dieser Arbeit die Korrelation der Enzymaktivitäten mit den jeweiligen IFN-Spiegeln im Serum.

II. Anwendungsbeispiele

a) In Lymphocytenextrakten gesunder erwachsener Versuchspersonen erwiesen sich die Enzymaktivitäten als relativ konstant. Bei den untersuchten Kindern ergaben sich aber große Schwankungen, die auf ihrer Vorgeschichte, ihrem Alter u.a. beruhen könnten.
Für einige Erkrankungen wurden die Ergebnisse in Gruppen eingeteilt, die zwar nicht statistisch abgesichert sind,

aber richtungsweisend sein können für einen Zusammenhang zwischen den bestimmten Enzymaktivitäten und diesen Krankheiten:

- eine Gruppe mit Werten (abgekürzt mit x)

$$x \leq 1$$

d.h. gleich oder unter dem Normalbereich

In dieser Gruppe fanden sich v.a. die Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie vor Therapie.
Es findet sich eventuell eine Bestätigung für die These, daß wenig differenzierte, schnell proliferierende Gewebe niedrige Enzymspiegel haben.

- eine Gruppe mit Werten

$$1 \leq x \leq 10$$

Hier fand sich der Großteil der Kinder, einschließlich der Kinder mit bakteriellen Infekten und Tumorerkrankungen.

- eine Gruppe mit Werten

$$x > 10$$

Diese Gruppe umfaßte die Kinder mit viralen Infekten und die Kinder unter IFN-Therapie.
Daraus läßt sich ableiten, daß unter Viruseinfluß vermehrt 2-5 Synthetase gebildet wird.

b) Für Tumorzellinien ergaben sich bereits nach kurzer IFN-Exposition stark erhöhte Werte, während die Ausgangswerte ohne Stimulation sehr niedrig lagen.
Besonders hoch waren die Anstiege bei Zellinien, die gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung durch IFN relativ unempfindlich sind (CCL 127 und RD).
SAOS 2 zeigte einen weniger hohen Anstieg.
Es muß angemerkt werden, daß die Zellen nach kurzer IFN-Stimulation ohne IFN über 24 Stunden weiter inkubiert wurden.
Die Enzymanstiege waren um so höher, je höher die verwandte IFN-Konzentration war.

Nach einer Dauerexposition über 24 Stunden änderte sich die Enzymaktivität nicht mehr wesentlich, außer bei SAOS 2, bei der ein linearer Anstieg nachweisbar war. Daraus eine Folgerung zu ziehen hinsichtlich der Aufgaben der 2-5 Synthetase im Zusammenhang von antiproliferativer und antiviraler Wirkung von IFN, ist schwierig.
Es scheint aber, daß besonders die Zelltypen eine erhöhte 2-5 Synthetaseaktivität unter IFN haben, die gegenüber den wachstumshemmenden Effekten von IFN relativ unempfindlich sind.
Auch die unterschiedlichen Wirkungen von α-, β-, γ-IFN im Vergleich zu antiproliferativen Wirkungen ist erwähnenswert. Während α und β-IFN ungefähr gleich stark wirkten, war unter γ-IFN der Enzymanstieg nicht so stark, obwohl für γ-IFN eine sehr starke proliferationshemmende Wirkung nachgewiesen werden konnte (123).
Die klinische Bedeutung des Nachweises der 2-5 Synthetase als diagnostische Methode für bestimmte Erkrankungen, z.B. virale Infektionen muß durch weitere Untersuchungen belegt werden.
Ebenso wichtig ist die Klärung der sicherlich zahlreichen Aufgaben der 2-5 Synthetase im Zellstoffwechsel.

7. Literaturverzeichnis

1. Ankel H., Krishnamurti C., Besancon F., Stefanos S., Falcoff E.
   Mouse fibroblast (type I) and immune (type II) interferons : Pronounced differences in affinity for gangliosides and in antiviral and antigrowth effects on mouse leukemia L 1210 R cells.
   Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 : 2528-2532 (1980)

2. Aujean O., Sanceau J., Falcoff E., Falcoff R.
   Location of enhanced ribonuclease activity and of a phosphoproteinkinase in interferon-treated mengovirus-infected cells.
   Virology 92 : 583-586 (1979)

3. Baglioni C.
   Interferon-induced enzymatic activities and their role in the antiviral state.
   Cell 17 : 255-264 (1979)

4. Baglioni C., Benvin S., Maroney P., Minks M., Nilsen T., West D.
   Interferon-induced enzymes: activation and role in the antiviral state.
   Ann.NY.Acad.Sci. 350 : 497-509 (1980)

5. Baglioni C., Maroney P.A.
   Human leukocyte interferon induces 2'5'oligo(A) polymerase and proteinkinase.
   Virology 101 : 540-544 (1980)

6. Baglioni C., Maroney P.A.
   Mechanisms of action of human interferon.
   J.Biol.Chem. 255 : 8390-8393 (1980)

7. Baglioni C, Maroney P.A., West D.K.
2'5' oligo(A) polymerase activity and inhibition of viral RNA synthesis in interferon-treated HeLa cells.
Biochemistry 18 : 1765-1770 (1979)

8. Baglioni C., Minks M., Maroney P.A.,
Interferon action may be mediated by activiation of a nuclease by pppA2'p5'A2'p5'A.
Nature 273 : 684-687 (1978)

9. Baglioni C., Nilsen T.W.
The action of interferon at the molecular level.
Am.Sci. 69 : 392-399 (1981)

10. Ball L.A.
Induction of 2'5' oligoadenylate synthetase activity and an new protein by chick interferon.
Virology 94 : 282-296 (1979)

11. Ball L.A.
Induction, purification and properties of 2'5' oligo-adenylate synthetase.
Ann.NY.Acad.Sci. 350 : 486-496 (1980)

12. Ball L.A., White C.N.
Effect of interferon preteatment on coupled transcription and translation in cell-free extracts of primary chick embryo cells.
Virology 84 : 496-508 (1978)

13. Ball L.A., White C.N.
Oligonucleotide inhibitor of protein synthesis made in extracts of interferon-trated chick embryo cells: comparison with the mouse low molecular weihgt inhibitor.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75 : 1167-1171 (1978)

14. Ball L.A., White C.N.
Nuclease activation by dsRNA and by 2'5' oligoadenylate in extracts of interferon-treated chick cells.
Virology 93 : 348-356 (1979)

15. Berman B., Vilcek J.
Cellular binding characteristics of human interferon.
Virology 57 : 378-386 (1974)

16. Broeze R.J., Dougherty J.P., Pichon J., Jayaram B.M., Lengyel P.
Studies with pure mouse Ehrlich ascites tumor interferons α and ß: patterns of induction of $(2'-5')(A)_n$ synthetase and of a double-stranded RNA-dependent proteinkinase in mouse cells and human cells.
J.Interferon Res. 1 (2) : 191-201 (1981)

17. Brown G.E., Lebleu B., Kawakita M., Shaila S., Sen G.C., Lengyel P.
Increased endonuclease activity in an extract from mouse Ehrlich ascites tumor cells wich had been trated with a partially purified interferon-preparation: dependence on double-stranded RNA.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 69 : 114-122 (1976)

18. Burke D.C., Graham O.F., Lehman J.M.
Appearance of interferon inducibility and sensitivity during differentiation of murine teratocarcinoma cells in vitro.
Cell 13 : 243-248 (1978)

19. Cantell K., Hirvonen S.
Preparation of human leukocyte interferon for clinical use.
Tex.Rep.Biol.Med. 35 : 138-144 (1977)

20. Chernajovsky Y., Kimchi A., Schmidt A., Zilberstein A., Revel M.
Differential effects of two interferon-induced translational inhibitors on initiation of protein synthesis.
Eur.J.Biochem. 96 : 35-41 (1979)

21. Clemens M., Vaquero C.
Inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA in retivulocyte lysates : evidence for activation of an endonuclease.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 83 : 59-68 (1978)

22. Clemens M., Williams B.R.G.
Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2'p5'A2'p5'A : a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts.
Cell 13 : 565-572 (1978)

23. Colby C., Morgan M.I.
Interferon induction and action.
Ann.Rev.Microbiol. 25 : 333-360 (1971)

24. DeHaro C., Datta A., Ochoa S.
Mode of action of the hemin-controlled inhibitor of protein synthesis.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75 : 243-247 (1978)

25. Dianzani F., Zucca M., Scupham A., Georgiades J.A.
Immune and virus-induced interferons may activate cells by different derepressional mechanisms.
Nature 283 : 400-402 (1980)

26. Dougherty J., Samanta H., Farrell P., Lengyel P.
Interferon, double-stranded RNA and RNA degradiation.
J.Biol.Chem. 255 : 3813-3816 (1980)

27. Eppstein D.A., Peterson T.C., Samuel C.E.
Mechanisms of interferon action : synthesis and activity of the interferon-mediated low molecular weight oligonucleotide from murine and human cells.
Virology 98 : 9-19 (1979)

28. Eppstein D.A., Samuel C.E.
Mechanism of interferon action. Partial purification and characterisation of a low molecular weight interferon-mediated inhibitor of translation with nucleolytic activity.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 79 : 145-153 (1977)

29. Eppstein D.A., Samuel C.E.
Mechanism of interferon action. Properties of an interferon-mediated ribonucleolytic activity from mouse L 929 cells.
Virology 89 : 240-251 (1978)

30. Falcoff E., Falcoff R., Lebleu B., Revel M.
Interferon treatment inhibits mengo RNA and haemoglobin mRNA translation in cell-free extracts of L cells.
Nature New Biol. 240 : 145-147 (1972)

31. Farrell P.J., Balkow K., Hunt T., Jackson R.
Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis.
Cell 11 : 187-200 (1977)

32. Farrell P.J. Broeze R.J., Lengyel P.
Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumor cells.
Nature 279 : 523-525 (1979)

33. Farrell P.J. Sen G.C., Dubois M.F., Ratner L., Slattery E., Lengyel P.
Interferon action: two distinct pathways for inhibition of protein synthesis by double-stranded RNS.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75 : 5893-5897 (1978)

34. Finter N.B. (ed.)
Interferon and interferon inducers.
2nd edition, Amsterdam, North-Holland 1973

35. Floyd-Smith G., Slattery E., Lengyel P.
Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5') oligoadenylate-dependent endonuclease.
Science 212 : 1030-1032 (1981)

36. Fogh J., Wright C.W., Loveless J.D.
Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.
J.Natl.Cancer Inst. 58 : 209-214 (1977)

37. Friedman R.M.
Antiviral activity of interferons.
Bact.Rev. 41 : 543-567 (1977)

38. Friedman R.M., Metz D.H., Esteban R.M., Tovell D.R., Ball L.A., Kerr I.M.
Mechanism of interferon action: Inhibition of viral mRNA translation in L-cell extracts.
J.Virol. 10 : 1184-1198 (1972)

39. Golgher R.R., Williams B.R.G., Gilbert C., Brown R.E., Kerr I.M.
Proteinkinase activity and the natural occurrence of 2-5 A in interferon-treated EMC virus-infected L-cells.
Ann.NY.Acad.Sci. 350 : 448-458 (1980)

40. Gresser J., Tovey M.G., Maury C., Bandu M.T.
Role of interferon in the pathogenesis of virus disease in mice as demonstradted by the use of anti-interferon serum.
J.Exp.Med. 144 : 1316-1323 (1976)

41. Gupta S.L., Rubin B.Y., Holmes S.L.
Interferon action: induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 : 4817-4821 (1979)

42. Gupta S.L., Sopori M.L., Lengyel P.
Inhibition of protein synthesis directed by added viral and cellular messenger RNA in extracts of interferon-treated Ehrlich ascites tumor cells. Location and dominance of the inhibitors.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 240 : 777-783 (1973)

43. Hovanessian A.G.
Intracellular events in interferon-treated cells.
Differentiation 15 : 139-151 (1973)

44. Hovanessian A.G. Brown R.E., Kerr I.M.
Synthesis of low molecular weight inhibitor of protein synthesis with enzyme from interferon-treated cells.
Nature 268 : 537-540 (1977)

45. Hovanessian A.G., Kerr I.M.
Synthesis of an oligonucleotide inhibitor of protein synthesis in rabbit retculocyte lysates analogous to that formed in extracts from interferon-treated cells.
Eur.J.Biochem. 84 : 149-159 (1978)

46. Hovanessian A.G., Kerr I.M.
The (2'-5') oligoadenylate (pppA2'-5'A2'-5'A) synthetase and protein kinase(s) from interferon-treated cells.
Eur.J.Biochem. 93 : 515-526 (1979)

47. Hovanessian A.G., Meurs E., Montagnier L.
Lack of systematic correlation between the interferon-mediated antiviral state and the levels of 2-5 A synthetase and protein kinase in three different types of murine cells.
J.Interferon Res. 1(2) : 179-190 (1981)

48. Hovanessian A.G., Rivière Y.
Interferon-mediated induction of 2-5 A synthetase and protein kinase in the liver and splee of mice infected with Newcastle virus of injected with poly (I) poly (C).
Ann.Virol. 131 : 501-516 (1980)

49. Hovanessian A.G., Wood J.N.
Anticellular and antiviral effects of $pppA(2'p5'A)_n$.
Virology 101 : 81-90 (1980)

50. Hovanessian A.G., Wood J.N., Meurs E., Montagnier L.
Increased muclease activity in cells treated with pppA2'p5'A2'p5'A.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 : 3261-3265 (1979)

51. Isaacs A., Lindenmann J.
Virus interference. I. The interferon.
Proc.R.Soc.Lond.Biol.Sci. 147 : 258-267 (1957)

52. Jarvis A.P., White C., Ball L.A., Gupta S.L., Ratner L., Sen G.C., Colby C.
Interferon-associated, dsRNA dependent enzyme activities in a mutant 3T6 cell engaged in the semiconstitutive synthesis of interferon.
Cell 14 : 879-887 (1978)

53. Joklik W.K., Merigan T.C.
Concerning the mechanism of action of interferon.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 56 : 558-565 (1966)

54. Justesen J., Ferbus D., Thang M.N.
Properties of 2'5' oligoadenylate synthetase.
Ann.NY.Acad.Sci. 350 : 510-521 (1980)

55. Kerr I.M., Brown R.E., Ball L.A.
Increased sensitivity of cell-free protein synthesis to double-strandet RNA after interferon treatment.
Nature 250 : 57-59 (1974)

56. Kerr I.M., Brown R.E., Clemens M.I. Gilbert C.S.
Interferon-mediated inhibition of cell-free protein synthesis in response to double-stranded RNA.
Eur.J.Biochem. 69 : 551-561 (1976)

57. Kerr I.M., Brown R.E., Hovanessian A.G.
Nature of inhibitor of cell-free protein synthesis formed in response to interferon and double-strandet RNA.
Nature 268 : 540-542 (1977)

58. Kerr I.M., Brown R.E.
pppA2'p5'A2'p5'A an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75 : 256-260

59. Kerr I.M., Wreschner D.H., Silverman R.H., Cayley P.J., Knight M.
The 2-5 A (pppA2'p5'A2'p5'A) and protein kinase systems in interferon treated and control cells.
Adv.Cycl.Nucl.Res. 14 : 469-478 (1981)

60. Kimchi A.
Increased levels of interferon-induced /2'-5') oligoisoadenylate synthetase in mature T-lymphocytes and in differentiated Friend-erythroleukemic cells.
J.Interferon Res. 4 : 559-569 (1981)

61. Kimchi A., Shulman L., Schmidt A., Chernajovsky Y., Fradin A., Revel M.
Kinetics of the induction of three translation - regulatory enzymes by interferon.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 : 3208-3212 (1979)

62. Kimchi A., Shure H., Revel M.
Regulation of lymphocyte mitogenesis by (2'-5') oligoisoadenylate.
Nature 282 : 849-851 (1979)

63. Kimchi A., Shure H., Lapidot Y., Rapoport S., Panet A., Revel M.
Antimitogenic effects of interferon and (2'-5') oligoadenylate in synchronized 3T3 fibroblasts.
FEBS Lett. 134 : 212-216 (1981)

64. Kimchi A., Shure H., Revel M.
Anti-mitogenic function of interferon-induced (2'-5') oligo(adenylate) and growth-related variations in enzymes thät synthesize and degrade this oligonucleotide.
Eur.J.Biochem. 114 : 5-10 (1981)

65. Knight M., Cayley P.J., Silverman R.H.
Wreschner D.H., Gilbert C.S., Brown R.E., Kerr I.M.
Radioimmune, radiobinding and HPLC analysis of 2-5 A and related oligonucleotides from intact cells.
Nature 288 : 189-192 (1980)

66. Knight E., Korant B.
Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 : 1824-1827 (1979)

67. Krishnan I., Baglioni C.
2'5' oligo (A) polymerase activity in serum of mice infected with EMC virus or treated with interferon.
Nature 285 : 485-488 (1980)

68. Krishnan I., Baglioni C.
Increased levels of (2'-5') oligo (A) polymerase activity in human lymphoblastoid cells treated with glucocorticoids.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 : 6506-6510 (1980)

69. Krishnan I., Baglioni C.
Regulation of 2'5' oligo (A) polymerase activity in quiescent human fibroblasts treated with interferon.
Virology 111 : 666-670 (1981)

70. Kubli H.
Zur Kenntnis von Anionentrennungen mittels Adsorption an Tonerde.
Helv.Chim.Acata 36 : 453-463 (1947)

71. Lebleu B., Sen G.C., Shaila S., Cabrer B., Lengyel P.
Interferon, double-stranded RNA and protein phosphorylation.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73 : 3107-3111 (1976)

72. Lengyel P., Samanta H., Pichon J., Dougherty J., Slattery E., Farrell P.
Double-stranded RNA and the enzymology of interferon action
Ann.NY.Acad.Sci. 350 : 441-447 (1980)

73. Levin S., Hahn T.
The inferferon system: A new assay and its clinical implications.
Pedait.Res. 14 : 1416-1416 (1980)

74. Levintow L.
in "Comprehensive Virology"
(H.Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner, eds.)
Vol.2, chap 3 Plenum Press New York (1974)

75. Levy H.P., Riley R.L.
Effect of interferon treatment on cellular messenger RNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70 : 3815-3819 (1973)

76. Lewis J.A., Falcoff E., Falcoff R.
Dual action of double-stranded RNA in inhibiting protein synthesis in extracts of interferon-treated mouse L cells.
Eur.J.Biochem. 86 : 497-509 (1978)

77. deLey M., Billiau A., de Somer P.
Interferon-induced synthesis of a 63.000 dalton protein in mouse cells.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 89 : 701-705 (1979)

78. McAllister J.
A continous human cell line derived from rhabdomyosacoma.
Cancer 24 : 520-526 (1969)

79. Maenner H., Brandner G.
Interferon action may not be effected by induction of cellular ribonuclease.
Nature 260 : 637-638 (1976)

80. Marcus P.J., Terry T.M., Levine S.
Interferon action II. Membrane-bound alkaline ribonuclease activity in chick embryo cells manifesting interferon-mediated interference.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72 : 182-186 (1975)

81. Martin E.M., Bridsall N.J., Brown R., Kerr I.M.
Enzyme synthesis, characterisation and nuclear-magnetic-resonance spectra of ppp A2'p5'A2'p5'A with chemically synthesized material.
Eur.J.Biochem. 95 : 295-307

82. Matthews T.H.J., Lawrence M.K.
Serum interferon assay as a possible test for virus infections of man.
Arch.Virol. 59 : 35-38 (1979)

83. Mayr U., Bermayer H.P., Weidinger G., Jungwirth C., Gross H.J., Bodo G.
Release of interferon-induced translation inhibition by tRNA in cell-free extracts from mouse erythroleukemia cells.
Eur.J.Biochem. 76 : 541-551 (1977)

84. Meldolesi M.F., Friedman R.M., Kohn L.D.
An interferon-induced increase in cyclic AMP levels precedes the establishment of the antiviral state.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 79 : 239-246 (1977)

85. Merlin G., Revel M., Wallach D.
The interferon induced enzyme oligo-isoadenylate synthetase: rapid determination of its in vitro products.
Analyt.Biochem. 110 : 190-196 (1981)

86. Meurs E., Hovanessian A.G., Montagnier L.
Interferon-mediated antiviral state in human MRC5 cells in the absence of detectable levels of 2-5 A synthetase and protein kinase.
J Interferon Res. 1 (2) : 219-232 (1981)

87. Metz D.H.
The mechanism of action of interferon.
Cell 6 : 429-439 (1975)

88. Minks M.A., Benvin S., Maroney P.A., Baglioni C.
Metabolic stability of 2'5' oligo (A) and activity of 2'5' oligo (A) dependent endonuclease in extracts of interferon-treated and control HeLa cells.
Nucl.Acid.Res. 6 : 767-780 (1979)

89. Minks M., Benvin S., Maroney P., Baglioni C.
Synthesis of 2'5' oligo (A) in extracts of interferon treated HeLa cells.
J.Biol.Chem. 254 : 5058-5064 (1979)

90. Minks M., Benvin S., Maroney P., Baglioni C.
Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2'-5' oligo (A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells.
J.Biol.Chem. 254 : 10180-10183 (1979)

91. Morag A., Tobi M., Ravid Z., Revel M., Schattner A.
Increased (2'-5') oligo A Synthetase activity in patients with prolonged illness associated with serological evidence of persistent Epstein-Barr virus infection.
Lancet 1 : 744-744 (1981)

92. Nagata S., Taire H.
Synthesis in E.coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity.
Nature 284 : 316-320 (1980)

93. Nilsen T.W., Baglioni C.
Mechanism for discrimination between viral and host mRNA in interferon-treated cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 : 2600-2604 (1979)

94. Nilsen T.W., Wood D.L., Baglioni C.
Virus-specific effects of interferon in embryonal carcinoma cells.
Nature 286 : 178-180 /1980)

95. Panet A., Czarniecki C.W., Falk H., Friedman R.M.
Effect of 2'-5' oligoadenylic acid on a mouse cell line partially resistent to interferon.
Virology 114 : 567-572 (1981)

96. Parry R., Parry Q.
Interferon assay as a diagnostic test.
Lancet 1 : 506-507 (1981)

97. Radke K.L., Colby C., Kates J.R., Krider H.M., Prescott D.M.
Establishment and maintenance of the interferon-induced antiviral state: Studies in enucleated cells.
J.Virol. 13 : 623-630 (1974)

98. Ratner L., Sen G.C., Brown G.E., Lebleu B., Kawakita M., Cabrer B., Slattery E., Lengyel P.
Interferon, double-strandet RNA and RNA degradation.
Eur.J.Biochem. 79 : 565-577 (1977)

99. Ratner L., Wiegand R.C., Farrell P.I., Sen G.C., Cabrer B., Lengyel P.
Interferon, double-stranded RNA and RNA degradation. Fractination of the endonuclease INT system into two macromolecular components: role of a small molecule in nuclease activation.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 81 : 947-954 (1978)

100. Revel M., Kimchi A., Schmidt A., Shulman L., Chernajovsky Y., Rapoport S., Lapidot Y.
in "Regulation of Macromolecular Synthesis"
(Koch G., Richter D., eds.) 284-302
Academic Press NY, 1979

101. Revel M., Kimchi A., Shulman L., Fradin A., Shuster R., Yakobson E., Chernajovsky Y., Schmidt A., Shure A., Bendori R.
Role of interferon-induced enzymes in the antiviral and antimitogenic effects of interferon.
Ann.NY.Acad.Sci. 350 : 459-472 (1980)

102. Revel M., Schmidt A., Shulman L., Zilberstein A., Kimchi A.
The regulation of protein synthesis by interferon.
FEBS Meet.12th 51 : 415-426 (1978)

103. Roberts W.K., Clemens M.I., Kerr I.M.
Interferon-induced inhibition of protein synthesis in L-cell extracts: An ATP-dependent step in the activation of an inhibitor by double-strandet RNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73 : 3136-3140 (1976)

104. Roberts W.K. Hovanessian A., Brown R.E., Clemens M.I., Kerr I.M.
Interferon-mediatied protein kinase and low molecular weight inhibitor of protein synthesis.
Nature 264 : 477-480 (1976)

105. Samanta H., Dougherty J.P., Lengyel P.
Synthesis of (2'-5') $(A)_n$ from ATP.
J.Biol.Chem. 255 : 9807-9813 (1980)

106. Samuel C.E., Joklik W.K.
A protein synthesizing system from interferon-treated cells that discriminates between cellular and viral messenger RNA.
Virology 58 : 476-491 (1974)

107. Samuel C.E., Kingsman S.M., Melamed R.W., Farris D.A., Smith M.D., Miyamoto N.G., Lasky S.R., Knutson G.S.
Mechanisms of interferon-mediated inhibition of protein synthesis.
Ann.NY.Acad.Sci. 350 : 473-485 (1980)

108. Schattner A., Merlin G., Wallach D., Rosenberg H., Bino T., Levin S., Revel M.
Monitoring of interferon therapy by assay of (2'-5') oligo-isoadenylate synthetase in human peripheral white blood cells.
J.Interferon Res. 4 : 587-596 (1981)

109. Schattner A., Merlin G., Levin S., Wallach D., Hahn T., Revel M.
Assay of an interferon-induced enzyms in white blood cells as a diagnostic aid in viral disease.
Lancet 2 : 497-500 (1981)

110. Schmidt A., Chernajovsky Y., Shulman L., Federman P., Berissi H., Revel M.
An interferon-induced phosphodiesterase degrading (2'-5') oligo isoadenylate and the C-C-A terminus of tRNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 : 4788-4792 (1979)

111. Schmidt A., Zilberstein A., Shulman L, Federman P., Berissi H., Revel M.
Interferon action: Isolation of nuclease F, a translation inhibitor activated by interferon-induced (2'-5') oligo isoadenylate.
FEBS Lett. 95 : 257-264 (1978)

112. Sehgal P., Gupta S.
Regulation of the stability of poly (I) poly (C) induced human fibroblast interferon mRNA: Selective inactivation of interferon mRNA and lack of involvement of 2'-5' oligo (A) synthetase activation during the shutoff of interferon production.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 : 3489-3493 (1980)

113. Sen G.C., Gupta S.L., Brown G.E., Lebleu B., Rebello M.A., Lengyel P.
Interferon treatment of Ehrlich ascites tumor cells: effects on exogenous mRNA translation and tRNA inactivation in cell extracts.
J.Virol. 17 : 191-203 (1976)

114. Sen G.C., Lebleu B., Brown G.E., Rebello M.A., Furuichi Y., Morgan M., Shatkin A.J., Lengyel P. Inhibition of reovirus mRNA methylation in extracts of interferon-treated Ehrlich ascites tumor cells. Biochem.Biophys.Res.Comm. 65 : 427-434 (1975)

115. Shimizu N., Sokawa Y. 2'5' oligoadenylate synthetase activity in lymphocytes from normal mouse. J.Biol.Chem. 254 : 12034-12037 (1979)

116. Shulman L., Revel M. Interferon-dependent induction of mRNA activity for (2'-5') oligo-adenylate synthetase. Nature 288 : 98-100 (1980)

117. Slattery E., Ghosh N., Samanta H., Lengyel P. Interferon, double-stranded RNA and RNA degradation: Activation of an endonuclease by (2'-5') A_n. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 : 4778-4782 (1979)

118. Sokawa Y. Induction of poly (I):(C) -binding 50 K protein and 2'5' oligoadenylate synthetase in interferon-treated mouse L 929 cells. J.Biochem. 88 : 159-166 (1980)

119. Stark G.R., Dower W.I., Schimke R.T., Brown R.E., Kerr I.M. 2-5 A synthetase: assay, distribution and variation with growth or hormone statur. Nature 278 : 471-473 (1979)

120. Stewart W.E. II The Interferon System Springer Verlag, New York (1979)

121. Taylor J.
Inhibition of interferon action by actinomycin.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 14 : 447-451 (1964)

122. Thang M.N., Ferbus D., Besancon F., Bourgeard M.F., Justesen J.
2'5' nucleotidyl-transferase: Enzymological properties and regulation mechanism
The Biology of the Interferon System
(de Maeyer E., Galasso G., Schellekens H., eds.)
129-134
Elsevier, North Holland Biomedical Press (1981)

123. Treuner J., Dannecker G.
Interferon - Grundlagen und bisherige klinische Anwendung.
Fortschr.Med. 99 : 807-813 (1981)

124. Treuner J., Dannecker G., Joester K.E., Hettinger A., Niethammer D.
Pharmacological aspects of clinical stage I/II trials with human beta interferon in children.
J.Interferon Res. 1(3) : 373-380 (1981)

125. Tumilowicz J.J., Nicols W.W., Cholon J.J., Greene A.E.
Definition of a continous human cell line derived from neuroblastoma.
Cancer Res. 30 : 2110-2118 /1970)

126. Vandenbussche P., Divizia M., Verhaegen-Lewalle M., Fuse A., Kuwata T., Clercq E., Content J.
Enzymatic activities induced by interferon in human fibroblast cell lines differing in their sensitivity to the anticellular activity of interferons.
Virology 111 : 11-22 (1981)

127. Verhaegen M., Divizia M., Vandenbussche P., Kuwata T., Content J.
Abnormal behaviour of interferon-induced enzymatic activities in an interferon resistent cell line.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 : 4479-4483 (1980)

128. Weissenbach J., Dirkeimer G., Falcoff R., Sanceau J., Falcoff E.
Yeast-tRNA - Leu (Anticodon U-A-G) translates all six leucine in extracts from interferon treated cells.
FEBS Lett. 82 : 71-76 (1977)

129. Wallach D., Revel M.
An interferon-induced cellular enzyme is incorporated into virions.
Nature 287 : 68-70 (1980)

130. Williams B.R.G., Kerr I.M.
Inhibition of protein synthesis by 2'-5' linked adenine oligonucleotides in intact cells.
Nature 276 : 88-90 (1978)

131. Williams B.R.G., Kerr I.M., Gilbert C., White C.N., Ball L.A.
Synthesis and breakdown of pppA2'p5'A2'p5'A and transient inhibition of protein synthesis in extracts from interferon-treated and control cells.
Eur.J.Biochem. 92 : 455-462 (1978)

132. Williams B.R.G., Gilbert C.S., Kerr I.M.
The respective roles of protein kinase and pppA2'p5'A2'p5'A activated endonuclease in the inhibition of protein synthesis by dsRNA in rabbit reticulocyte lysates.
Nucl.Acid.Res. 6 : 1335-1351 (1979)

133. Williams B.R.G., Golgher R.R., Kerr I.M.
Activation of a nuclease by pppA2'p5'A2'p5'A in intact cells.
FEBS Lett. 105 : 47-52 (1979)

134. Williams B.R.G., Read S.E.
Detection of elevated levels of the interferon-induced enzyme, 2-5 A synthetase in infectious diseases and on parturition.
The Biology of the Interferon System 111-114
Elsevier, North-Holland Biomedical Press (1981)

135. Wood J.N., Hovanessian A.
Interferon enhances 2-5 A synthetase in embryonal carcinoma cells.
Nature 282 : 74-76 (1979)

136. Wreschner D.H., James T.C., Silberman R.H., Kerr I.M.
Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5 A ($ppp(A2'p)_nA$) in interferon-treated cells.
Nucl.Acid.Res. 9 : 1571-1581 (1981)

137. Yakobson E., Prives C., Hartmann J.R., Winocour E., Revel M.
Inhibition of viral protein synthesis in monkey cells treated with interferon lat in simian virus 40 Lytic cycle.
Cell 12 : 73-81 (1981)

138. Yang K., Samanta H., Dougherty J., Jayaram B., Broeze R., Lengyel P.
Interferons, double-stranded RNA and RNA-degradiation.
J.Biol.Chem. 256 : 9324-9328 (1981)

139. Zilberstein A., Federman P., Shulman L., Revel M. Specific phosphorylation in vitro of a protein associated with ribosomes of interferon-treated mouse L cells.
FEBS Lett. 68 : 119-124 (1976)

140. Zilberstein A., Kimchi A., Schmidt A., Revel M. Isolation of two interferon-induced translational inhibitors: A protein kinase and an oligo-isoadenylate synthetase.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75 : 4734-4738 (1978)

Lebenslauf

Am 09.06.1958 wurde ich, Irene Thomä, als Tochter der Dres.med. Helmut Thomä und Brigitte Thomä, geb. Hase, in Heidelberg geboren, wo ich von 1965 - 1968 die Volksschule besuchte.

Nach Berufung meines Vaters an die Universität Ulm und Übersiedlung der Familie ging ich dort ins Humboldt-Gymnasium. Das Abitur bestand ich am 18.05.1977.

Im Wintersemester 1977/78 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Ulm, die ärztliche Vorprüfung legte ich am 13.09.1979 ab.

Danach wechselte ich an die Universität Tübingen und schloß das Staatsexamen am 02.05.84 ab.